

Experimentelle Langzeituntersuchung von Klebeanastomosen an Kaninchencarotiden

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn**

**Vorgelegt von Christoph Björn Welzel
aus Bonn- Bad Godesberg**

2006

**Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. Welz**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. Fleischmann**

Tag der Mündlichen Prüfung: 2006

**Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Universitätskliniken, Bonn
Direktor Prof. Dr. med. Welz**

**Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.**

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Historische Entwicklungen und aktueller Standard in der Koronarchirurgie.....	7
1.2 Gewebekleber in der Chirurgie	9
1.2.1 Gelatin-Resorcin-Formalin (GRF)-Kleber	11
1.2.2 Fibrinkleber	13
1.2.3 Histoacryl-Kleber	14
1.2.4 Biologischer Albumin-Glutaraldehyd-Kleber (BioGlue)	14
1.3 Vorarbeiten zu Koronaranastomosen mit Bioglue	16
1.4 Ziel der Untersuchung	17
2. Material und Methoden	17
2.1 Tierexperimentelles Modell	17
2.1.1 Studiendesign	18
2.1.2 Versuchstiere	19
2.1.3 Anatomie der Versuchstiere	20
2.1.4 Anästhesie	21
2.1.5 Operationstechnik	22
2.1.5.1 Klebeanastomosen	22
2.1.5.2 Kleber auf ein natives Gefäßstück	26
2.1.5.3 Kontrollgruppe	26
2.2 Untersuchungsmethodik	27
2.2.1 Angiographische Untersuchung	27
2.2.1.1 Vorbereitung der Angiographie	28
2.2.1.2 Angiographietechnik	28
2.2.1.3 Angiographische Anatomie	29
2.2.2 Makroskopische Untersuchung	30
2.2.3 Histologische Untersuchung	30
2.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin- Färbung	32
2.2.3.2 Elastica van Gieson-Färbung nach Weigert	33
2.2.3.3 Makrophagenantikörper MAC- 387	34
2.2.3.4 Versilberung nach Kossa (Krutsay, 1963)	35
3. Ergebnisse	36
3.1 Angiographie	37
3.1.1 Stenosen	37
3.1.2 Aneurysmen	38
3.1.3 Abszessbildung	39
3.2 Makroskopie	40
3.2.1 Kapsel	40
3.2.2 Abszessbildung	41
3.2.3 Aneurysmen	42
3.2.4 Kleberbeschaffenheit	43
3.2.5 Verkalkungen	44
3.2.6 Stenosen	46
3.3 Histopathologische Untersuchung	46
3.3.1 Kapsel	46
3.3.2 Kleber	50
3.3.3 Entzündungszellen	54

3.3.3.1	Immunhistochemie.....	59
3.3.4	Verkalkungen.....	61
3.3.4.1	Kalknachweis nach Kossa.....	64
3.3.5	Thromben	65
3.3.6	Endothel	68
3.3.7	Kollagenneogenese	69
4.	Diskussion	71
5.	Zusammenfassung	83
6.	Literaturverzeichnis.....	86
7.	Lebenslauf	96

1. Einleitung

1.1 Historische Entwicklungen und aktueller Standard in der Koronarchirurgie

Seit Einführung der Herz-Lungen-Maschine durch Gibbon im Jahre 1953 (Gibbon 1954) erlebte die Herzchirurgie einen rasanten Aufschwung. Mit der Entwicklung der Koronararteriographie (Herzkatheter) durch Sones und Shirey (Sones et al. 1962) konnte die Koronarchirurgie, die bis dahin nur ansatzweise versucht worden war, erfolgreich entwickelt werden. Die erste Bypassoperation der linken Arteria thoracica interna auf den Ramus interventricularis anterior der linken Koronarie wurde 1964 durch Kolesov durchgeführt. Bereits 1967 verwendeten Favaloro und Effler Vena saphena magna Grafts als Bypassgefäße. Hierbei wird die Arteria thoracica interna nach erfolgter Sternotomie von Höhe des ersten Intercostalraumes bis zum Übergang von Corpus sterni zum Xiphoid aus der Brustwandinnenseite freipräpariert und das distale Ende nach dem Absetzen mit einer Koronarie (Herzkranzgefäß) der Herzvorder- oder seitenwand anastomosiert. Die Vena saphena magna Grafts müssen nach der Anastomosierung mit einer Koronarie zusätzlich noch mit der Aorta ascendens verbunden werden. Die Anastomosierung findet mit feinem monofilem Polypropylen-Nahtmaterial in fortlaufender Nahttechnik statt. Damit begann eine neue Ära sowohl für die Therapie der koronaren Herzerkrankung wie auch für die Herzchirurgie.

Durch stetige Weiterentwicklung und Verbesserung, insbesondere das Gebiet der diagnostischen (Herzkatheter) und operativ verwendeter medizinisch-technischer Gerätschaften (HLM) betreffend, konnten im Verlauf des letzten Jahrzehnts immer mehr - vor allem ältere - Patienten einer operativen Behandlung zugeführt werden (Tab.1).

Jahr	Koronaroperationen mit HLM	Pat.zahl älter 60 Jahre
1990	26.094	38.6%
1995	52.129	37.95%
2000	72.894	72.21%

Tab.1: Anzahl der Bypassoperationen in der Bundesrepublik Deutschland unter Einsatz der Herz-Lungen- Maschine im Bezug zum Patientenalter > 60 Jahren im Vergleich 1990, 1995 und 2000 (E.Bruckenberg, Herzbericht 1990,1995, 2000)

Mit dem Anstieg des durchschnittlichen Patientenalters bei einem kardiochirurgischen Eingriff ist gleichzeitig die peri /postoperative Komplikationsrate gestiegen, da altersbedingt Begleiterkrankungen hinzutreten.

Ein Hauptfaktor für Morbidität und Mortalität bei kardiochirurgischen Operationen mit Einsatz der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) stellt die Dauer der sogenannten Aortenabklemmzeit dar, d.h. die Zeit, in der das Herz sich in kardioplegischem Stillstand befindet und die Herz-Lungen-Maschine eingesetzt ist (Kirklin et al. 1983). Durch den Kontakt des Blutes mit den synthetischen, Heparin- beschichteten Oberflächen des Schlauchsystems der Herz-Lungen-Maschine (Edmunds et al. 1993,1995,1998) kommt es über die Aktivierung verschiedener humoraler (Uoley 1990, 1994), zellulärer und metabolischer Systeme (Wilmore et al. 1985) zur Ganzkörper-Entzündungsreaktion. Es wurde nachgewiesen, dass die Konzentration des Komplementabbauproduktes C3a, welches für die Erhöhung mikrovaskulärer Permeabilität mitverantwortlich ist, mit zunehmender EKZ-Dauer steigt (Smith et al. 1987, Kirklin et al. 1983). Trotz Suppression dieser Systeme im extrakorporalen Bypass kann es zur Mikrothrombenbildung und Mikroembolisation in Organen kommen, die sich unter anderem als zerebrale Schädigung mit neurophysiologischen Dysfunktionen manifestieren. Im Sinne der inflammatorischen Rückkopplung tritt eine vermehrte Membranpermeabilität mit generalisierter Ödemneigung und erhöhtem Volumenbedarf auf, was eine zusätzliche Belastung für den Kreislauf des Patienten bedeutet.

Durch modifizierte Operationstechniken wurde zunächst versucht, die EKZ-Dauer etwas zu verkürzen. Während der vergangenen fünf Jahre ermöglichten die Entwicklung und der Einsatz von sogenannten Myokard-Stabilisatoren die Anastomosierung der Bypassgefäße mit den Herzkranzgefäßen am schlagenden Herzen. (Benetti et al. 1996, Calafiore et al. 1996, Reichenspurner et al. 1998, Diegeler et al. 1999). Der hieraus entwickelte Ansatz der minimal-invasiven Chirurgie, worunter man einerseits den limitierten operativen Zugang, aber vor allem den Verzicht auf die Herz-Lungen-Maschine versteht, fand bzw. findet immer mehr Anklang, so dass 1999 bereits 3.969 Patienten (620 Patienten, 15,62%, mehr als im Vorjahr) auf diese Weise erfolgreich operiert werden konnten (E. Bruckenberger, Herzbericht 2000). Gleichzeitig will man im Sinne der minimal-invasiven Chirurgie die Belastung des Patienten durch große Operationswunden wie die Sternotomie

verringern, wobei als endgültiges Ziel die endoskopische Operation angestrebt wird. Die Gefäßanastomose wird bei diesen neuen Verfahren nach wie vor konventionell in fortlaufender Nahttechnik ausgeführt, was im Falle des endoskopischen Ansatzes bei einem bewegten oder bei einem auf wenige Zentimeter eingeeengten Operationsgebiet zu einem deutlich erhöhten Schwierigkeitsgrad führt. Bedingt durch die endoskopische Zugangsgröße, die jeweils gerade dem Instrumenquerschnitt entspricht, ist die Instrumentenbeweglichkeit gegenüber dem durch eine mediane Längssternotomie weit eröffneten Thorax, wie es bei der konventionellen Technik der Fall ist, enorm eingeschränkt. Deshalb ist der exakte Stich bezüglich Ansatz und Richtung nur schwer und aufwändig zu platzieren. Allein das korrekte Einspannen der Nadel ist sehr viel schwieriger, da dies unterstützt durch ein Zweitinstrument, welches gleichfalls deutlich eingeschränkt ist in seiner Beweglichkeit, erfolgen muss. Neueste Entwicklungen sind dazu übergegangen, endoskopisches Operieren mittels aufwändiger Robotertechnik (Telemanipulation) durchzuführen, wobei bereits erste Erfolge zu verzeichnen sind. Der Roboter bietet dabei Instrumente mit hoher Beweglichkeit auf kleinstem Raum, wobei der Chirurg von einer Steuerkonsole aus die Operation über eine 3D-Kamera-vermittelte Visualisierung durchführt (Mohr et al. 1999, Reichenspurner et al. 1999, Falk et al. 1999, Boehm et al. 1999). Die Anastomosierung gestaltet sich hierbei jedoch sehr schwierig, da der Operateur ohne taktilen Feedback zurechtkommen muss. Das heißt, es muss ohne Gefühl für Gewebs- oder Materialeigenschaften (z.B. Fadendehnung) allein mit optischer Hilfe operiert werden. Weitere Nachteile der Robotertechnik sind hohe Kosten und die erschwerte Erlernbarkeit der Technik mit einer damit verbundenen höheren Komplikationsrate. Weiter ist die Anastomosennaht am schlagenden Herzen, selbst mit Zuhilfenahme eines Stabilisators, auch deshalb aufwändiger, weil jeder einzelne Stich immer noch, wenn auch weitaus weniger als am nicht stabilisierten Herzen, an einer sich bewegenden Koronarie erfolgen muss.

1.2 Gewebekleber in der Chirurgie

Schon seit den frühen Anfängen der Chirurgie wurden Chirurgen mit perioperativen Problemen wie Blutungen, die zum einen in der Festigkeit der verschiedenen

Gewebetypen, zum anderen in den zum Teil mangelnd abdichtenden Eigenschaften des Nahtmaterials begründet sind, konfrontiert. Es erhob sich der Gedanke, einen Kleber oder ein Dichtungsmittel zu entwickeln, welches rasch bindet, schwaches Gewebe verstärkt und zusätzlich einen festen Halt garantiert.

Bereits 1968 postulierten Cooper und Falb in ihrem Bericht an der „New York Academy of Science“ folgende Merkmale bzw. Kriterien, die ein Kleber zum Einsatz in der Chirurgie erfüllen müsse.

Als erstes müsse der Kleber sich schnell an das lebende, sich umgebende Gewebe anpassen und binden, dürfe jedoch nicht an seiner Festigkeit verlieren. Die nahezu permanente Anwesenheit von Wasser, bzw. physiologischen Körperflüssigkeiten dürfe die Haltekraft des Klebers, die auf physikochemischen und molekularen Kräften beruht, nicht vermindern. Aus diesem Grund ergibt sich die Forderung, dass der Kleber im Kontakt mit Wasser bzw. Körperflüssigkeiten unlöslich oder nur sehr langsam löslich sei, aber die Geschmeidigkeit des Gewebes erhalten bliebe.

Zweitens sei es unerwünscht, wenn der Kleber lokale Irritationen oder gar toxische Geschehnisse hervorrufen könne.

Zu diesen immer noch aktuellen Anforderungen an einen Gewebekleber sind vor allem praktische Kriterien hinzugekommen. Der Kleber muss einfach zu handhaben sein, möglichst flüssig und in minimaler Dosierung aufgetragen werden, schnell aushärten, effektive und maximale Haltekraft entfalten. Die Verwendung von Hitze oder übermäßigem Druck zum Polymerisieren des Klebers verbietet sich hierbei. Aus diesem Grund ist es ratsam, Inhaltsstoffe zu verwenden, die als aktive Polymervorstufe vorliegen und bei physiologischem pH-Wert oder moderatem Druck eine effektive Festigkeit erlangen. Weiter sind die verschiedenen Bindungstypen, die der Kleber mit der biologischen Oberfläche des Gewebes eingeht, von besonderer Bedeutung. Vier verschiedene Bindungstypen, wie die elektrostatische, kovalente, metallische, chemische und zuletzt die physikalische Bindung, könnten theoretisch für die Haltefestigkeit des Klebers verantwortlich sein.

Gerade die chemische Bindung zwischen Kleberinhaltsstoffen und z.B. Kollagen, Amino, Hydroxyl oder Carboxylgruppen, die ca. 25% der Aminosäuren ausmachen, rücken auf Grund ihrer Variabilität von Bindungsmöglichkeiten in den Vordergrund. Eine Vielzahl von Produkten wurde im Laufe der Zeit entwickelt, experimentell getestet und klinisch angewendet. Das Augenmerk richtet sich hier auf folgende Gewebekleber: Gelatin-Resorcin-Formalin-Kleber (Laboratoires Cardinal; Saint-

Etienne; Frankreich + Laboratoires Microval; Saint-Just Malmont; Frankreich), Fibrinkleber (Tissucol; Immuno AG; Wien; Österreich + Biocol; Laboratoire Français du Fractionnement et des biotechniques; Courtaboeuf; Frankreich), Cyanoacrylat-Kleber (Glubran; General Enterprise Marketing; Viareggio; Italien) und den neu entwickelten BioGlue Surgical Adhesive (CryoLife Inc.; Kennesaw; GA; USA).

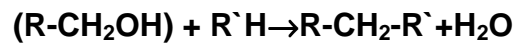
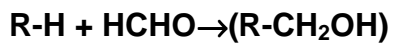
1.2.1 Gelatin-Resorcin-Formalin (GRF)-Kleber

Der seit 1989 industriell hergestellte GRF-Kleber (Laboratoires Cardinal; Saint-Etienne; Frankreich und Laboratoires Microval; Saint-Just Malmont; Frankreich) besteht aus zwei Komponenten, einer Gelatin-Resorcin und einer Formaldehyd-Glutaraldehyd-Mischung, die gebrauchsfertig in einem Klebmodul angeboten werden.

Die Gelatin-Resorcin-Mischung setzt sich aus 37,5 % Gelatine, 12,5% Resorcin, 1,25% Calciumchlorid und 48,75% destilliertem Wasser zusammen. Das Formaldehyd-Glutaraldehyd-Gemisch hingegen besteht aus 45% 9,25 prozentigem Formaldehyd, 3,6% 25 prozentigem Glutaraldehyd und 51,4 % destilliertem Wasser. Beim Auftragen des Klebers werden diese beiden Komponenten miteinander vermischt. Der Kleber nimmt bei einer Temperatur von 37°C und einem pH-Wert von 7,4 nach ca. 60-90 sec. an Festigkeit (Zugfestigkeit $200 \pm 25 \text{ g/cm}^2$) zu, was an einem Farbumschlag ins Milchigweiße sichtbar wird, verliert jedoch nicht an Elastizität. (Albes et al. 1993)

Das Wirkungsprinzip des GRF-Klebers ist vor allem durch die Ausbildung von Bindungen der Inhaltstoffe mit Seitenketten (Amino/Carboxyl/Hydroxygruppen etc.) von Aminosäuren der Oberflächenproteine und Bindungen der Inhaltstoffe untereinander bestimmt.

Als erstes binden Formaldehyd und Glutaraldehyd, denen eine vernetzende und fixierende Funktion zukommt, unter einer Reduktion an eine Amino-Gruppe eines Oberflächenproteins. Dieses gebildete reaktionsfreudige Zwischenprodukt heftet sich nun unter Abspaltung eines Wassermoleküls an eine Carboxyl-Gruppe einer anderen Nukleinsäure bzw. Oberflächenproteins (R/R').



Diese Vernetzung wird durch Gelatine unterstützt, die sich durch ihre spontanen Adhäsionsbemühungen wie eine Gelmatrix ausbreitet und sich über Wasserstoffbrücken mit dem umliegenden Gewebe verbindet. Die ausgebreitete Gelmatrix sorgt später für die Elastizität des Klebers. Formaldehyd und Glutaraldehyd verbinden sich sowohl mit der Gelatine, um die vernetzenden/ adhäsiven Untereinheiten zu einer makromolekularen Struktur zu verknüpfen, als auch mit dem beigemischten Resorchin.

Resorchin, molekularchemisch ein Ringaromat, kondensiert unter Ausbildung von Methylbrücken mit Formaldehyd, was für die schnelle Bindung zuständig ist, und Glutaraldehyd, das eine bessere Dauerhaftigkeit als Formaldehyd besitzt.

Durch die Verbindung der einzelnen aromatischen Ringe des Resorchins entsteht ein Makromolekül, welches durch die Reaktion von Resorchin mit Formaldehyd zu Resin nun eine wasserabweisende bzw. wasserunlösliche Komponente besitzt. Weiter besitzt Resorchin eine bakteriostatische Eigenschaft.

Das Resultat dieser Reaktionen ist der GRF-Klebstoff: Ein elastisches, wasserunlösliches, bakteriostatisches Makromolekül bestehend aus verknüpften aromatischen Ringen, vernetzt mit der makromolekularen Struktur der Gelatine. (Braunwald et al., 1966)

Seit Braunwald et al. (1966) den GRF-Kleber entwickelten und über ihn in ihrer ersten erfolgreichen Studie „geklebte Anastomosen an Vorhöfen und der Aorta“ berichteten, sind viele experimentelle Studien gelaufen, um den Kleber für den klinischen Einsatz zu modifizieren. (Koehnlein et al., 1969)

Vor allem durch die Versuche von Bachet et al. (1982, 1990, 1994, 1997, 1999) hat der GRF-Kleber Einzug in die Behandlung der Aortendissektion Typ A gehalten (Fukunagana et al 1999).

1.2.2 Fibrinkleber

Der Fibrinkleber (z.B. Tissucol, Immuno AG, Wien, Österreich; Biocol, Laboratoire Français du Fractionnement et des biotechniques, Courtaboeuf, Frankreich) ist ein biologisches Klebemittel, ähnlich den Fibrinmonomeren, die in der physiologischen Gerinnungskaskade anfallen. Er wurde in seiner Zusammensetzung und in seinen Eigenschaften erstmals von Seelich im Jahre 1982 beschrieben.

Ähnlich dem GRF-Kleber besteht der Fibrinkleber aus einem Zweikomponenten-System, deren Komponenten im Gegensatz zum GRF-Kleber erst erwärmt, aufgelöst und miteinander vermischt werden müssen, bevor man sie mittels eines sterilen Applikators oder in Form eines Sprays auf die Oberfläche auftragen kann.

Die erste Komponente des Fibrinklebers besteht aus einem Gemisch von getrocknetem humanem Fibrinogen, getrocknetem humanem Faktor XIII, humanem Fibronectin und Plasminogen. Durch das Hinzufügen von Humanalbumin, Natriumcitrat, Calciumchlorid und Fibrinolyseinhibitor Aprotinin werden die Teilchen in Lösung gehalten.

Die zweite Komponente enthält humanes Thrombin, Calciumchlorid, Glycin und wird durch Calciumchlorid in Verbindung mit Wasser verflüssigt.

Werden diese beiden Komponenten nun miteinander vermischt, ergibt sich folgendes Reaktionsmuster:

- Thrombin reagiert mit Fibrinogen unter Ausbildung von Fibrinmonomeren, welche sich untereinander zu einer gelartigen Matrix zusammenschließen.
- Gleichzeitig aktiviert Thrombin in Anwesenheit von Calcium-Ionen den Gerinnungsfaktor XIII, der in seine aktive Form (XIIIa) übergeht.
- Faktor XIIIa reagiert nun mit den Fibrinmonomeren und dem Fibronectin. Die Fibrinmonomere werden mit dem Fibronectin vernetzt, welches wiederum an die kollagenen Fasern des unterliegenden Gewebes bindet und für Stabilität sorgt. Ein großes Polymer ist entstanden.
- Während des Heilungsprozesses sorgen Plasminogenaktivatoren, die im unterliegenden Gewebe vorhanden sind, für die Aktivierung des klebereigenen Plasminogens, was die Fibrinolyse des Klebers veranlaßt. Trotz der Gegenwart von Aprotinin wird am Ende des Heilungsprozesses, bedingt durch Fibrinolyse oder Phagozytose, kein Kleber mehr sichtbar sein.

Der Fibrinkleber ist nach ca. 4-5 sec. ausgehärtet und sorgt somit für eine schnelle und effektive Hämostase. Im Gegensatz zum GRF-Kleber besitzt der Fibrinkleber mit

$63 \pm 25 \text{ g/cm}^2$ eine deutlich geringere mechanische Belastbarkeit. Aus diesem Grund schlugen Basu et al. (1995) vor, nachdem sie eine Vergleichsstudie dieser beiden Kleber betrieben hatten, daß der GRF-Kleber als „Gewebeverstärker“ z.B. bei Aortendissektionen Typ A eingesetzt werden solle und der Fibrinkleber im Falle einer schnellen Hämostase Vorzug finden solle.

1.2.3 Histoacryl-Kleber

Der Histoacryl-Kleber (Butyl-2-cyanoacrylat-Kleber, Fa. B.Braun AG, Melsungen) gehört zu den Cyanoacrylat- Kleber- Derivaten und stellt die Weiterentwicklung des von Coover et al. (1959) präsentierten Methyl-2-cyanoacrylat- Klebers dar, welcher durch eine starke histotoxische Gewebereaktion imponierte.

Der Austausch der Methyl-Gruppe durch langkettige Derivate (Butyl-/Isobutyl) bedingte eine Reduktion der Histotoxizität und ermöglichte somit den klinischen Gebrauch. (Leonard F., 1966)

Der Histoacryl-Kleber ist ein Einkomponenten- Klebstoff, der flüssig als doppelgebundenes Monomer vorliegt. Kommt dieses Klebermonomer mit Wasser oder NH_2 -Gruppen der Proteinmoleküle des Gewebes in Kontakt, induziert dies eine spontane Aufspaltung der Doppelbindung. Die zahlreichen Monomere polymerisieren unter Ausbildung einer festen kovalent-chemischen Bindung mit ihren Substraten und sind nach 7 sec. ausgehärtet. (Leonhard, 1966; Robiczek 1994) Die Zugfestigkeit des Klebers beträgt 159 g/cm^2 .

Das Einsatzgebiet des Histoacryl-Klebers beschränkt sich vorwiegend auf die Gebiete des Wundverschlusses und der Blutstillung (Toriumi et al. 1990).

1.2.4 Biologischer Albumin-Glutaraldehyd-Kleber (BioGlue)

Seit Einführung und Anerkennung des GRF-Klebers als ein probates Mittel zur Behandlung der Aortendissektion Typ A suchten Forscher nach einem noch effektiveren, weniger bzw. nicht toxischen Klebemittel. 1994 versuchten Ennker et al. das im GRF enthaltene Formaldehyd, welches einen erheblichen histotoxischen

Effekt aufweist, durch Glutaraldehyd oder Glyoxal zu substituieren. Sie erkannten, dass das Fehlen von Formaldehyd mit einem erheblichen Bindungsverlust der Klebermonomere gekoppelt war und somit das Produkt unbrauchbar war.

Diesen Forschungsansatz verfolgte die Firma Cryolife International Inc. (Kennesaw, GA) weiter und präsentierte 1995 den formaldehydfreien Bioglue.

Bioglue ist ebenfalls ein Zweikomponenten-Klebstoff und besteht zum einen aus 45 prozentigem gereinigtem bovinen Serum-Albumin, zum anderen aus 10 prozentigem Glutaraldehyd, die in einem Mischungsverhältnis von 4:1 beim Klebevorgang in der Spitze des Applikatormoduls zusammengeführt werden. Der Kleber fängt nach Applikation direkt an zu polymerisieren und entwickelt schon innerhalb von 20-30 sec. erste Adhäsionskräfte, während er nach 2-3 min. seine volle Haltekraft von $847 \pm 127 \text{ g/cm}^2$ entfaltet hat. (Yüksel et al. 1996, Produktinformation Cryolife, Inc. 1999) Das Bindungsreaktionsmuster von Bioglue ist dem Bindungsverhalten des GRF-Klebers sehr ähnlich:

Glutaraldehyd, welches zwei Aldehydgruppen besitzt, ist allgemein in der Lage, mit zwei Amino-Gruppen unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zu reagieren.

Der Amino-Gruppen-Donator ist die Seitenkette der Aminosäure Lysin, die sowohl physiologisch in Oberflächenproteinen, als auch 59 mal im globulären Protein Albumin vorkommt.

Es kommt also zu einer Quervernetzung des Albumins, welches auch untereinander vernetzt wird, mit den Oberflächenproteinen des Gewebes. Das bifunktionale Glutaraldehyd fungiert hierbei als Brücke.

Bei erfolgsversprechenden Versuchen der Aortendissektionen Typ A im Schafsmodell (Eddy et al. 1998), bei denen die getrennten Schichten zuerst geklebt und dann genäht wurden, konnte nach 90 Tagen ein signifikanter Rückgang der postoperativen Ruptur (30%→0%), Redissektion (17%→0%) und chronischen Dissektion (75%→0%) verzeichnet werden. Im Jahr 2001 beschrieben Hewitt et al. in ihren Experimenten an Schafen außerdem einen erheblichen Rückgang der postoperativen Blutungsrate. Weiter konnte eine nur sehr geringe Entzündungsreaktion auf den Kleber festgestellt werden. Nach klinischem Einsatz im Bereich der operativen Behandlung der Aortendissektion Typ A hat sich herausgestellt, daß Bioglue eine sinnvolle Alternative zum GRF-Kleber darstellt. (Küçükaksu et al. 2000, Kazui et al. 2001, Bingley et al. 2000, Ahmed et al. 2001, Chao et al. 2003, Coselli et al. 2003, Fabiani et al. 1990, Rhaanami et al. 2001)

1.3 Vorarbeiten zu Koronaranastomosen mit Bioglue

Erste erfolgreiche Einsatzversuche in der Koronarchirurgie wurden bei der Jahrestagung der American Association of Thoracic Surgeons 1999 von S. Gundry vorgetragen. Hierbei wurden Seit-zu-Seit- Anastomosen an toten Rinderherzen durchgeführt. Im Zeitraum von Dezember 1999 bis August 2001 erarbeitete eine Arbeitsgruppe der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie an der Universität Bonn unter der Leitung von Dr. med. W. Schiller eine Technik zur Erstellung von End-zu-Seit-Koronaranastomosen mit Hilfe von Bioglue an toten Schweineherzen. Dabei wurde an 30 Herzen eine Klebetechnik entwickelt, bei der unter Zuhilfenahme von kardiologischen Dilatationsballonen zur Schienung und Offenhaltung des Bypass-Koronar-Überganges Klebeanastomosen erstellt wurden. Die Anastomosen wurden einer pulsatischen Druckbelastung bis 300 mmHg ausgesetzt, das Offensein der Anastomose durch digitale Subtraktionsangiographie geprüft und die Kleber-Gewebe-Verbindung histologisch sowie mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Anastomosierung eines arteriellen Grafts an ein Koronargefäß mit einem Durchmesser von 1-3 mm durch Klebetechnik mit diesem Glutharaldehyd-Albumin-Gewebekleber mit guter Anastomosenqualität reproduzierbar ist. Der Kleber hat nach 2 Minuten 90% seiner maximalen Haltekraft erreicht, er hielt in dem Versuch akut einer pulsatischen Druckbelastung bis 300 mmHg stand. Der Zeitbedarf für eine Anastomosierung liegt im Bereich von 3-4 Minuten und ist somit deutlich kürzer als eine klassische Nahtanastomose (5-15 Minuten). Die Klebetechnik erfordert nur einen kleinen Bewegungsfreiraum und ist somit zur endoskopischen Anwendung gut geeignet (Schneider, 2004).

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie bestand eine experimentelle Kooperation mit der Studie von Herrn M. Kiderlen, geb. Faulhaber, an der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie der Universität Bonn. Beide Studien fertigten mittels Bioglue End-zu-End- Anastomosen an der Arteria carotis von Kaninchen an. Im Unterschied zu der hier vorliegenden Langzeituntersuchung erforschte Kiderlen das Kurzzeitverhalten der oben genannten Klebeanastomosen.

Kiderlen zeigte, dass es bereits nach drei Tagen bei mehr als 60% der Tiere zu einer mäßig bis starken Entzündungszellinvasion in die Gefäßwand kam. Weiter wurden in dieser Studie Stenosen, die durch eine Thrombenbildung im Spaltbereich zwischen den beiden nicht vollständig adaptierten Gefäßstümpfen bedingt waren, verzeichnet.

Aneurysmenbildung oder Gefäßverschlüsse wurden hingegen nicht festgestellt. Im Jahre 2000 beschrieben S. Gundry et al. erste Erkenntnisse über das in-vivo-Langzeitverhalten des Klebers nach Seit-zu-Seit- Anastomosierung bei zwei Ziegen. Nach 10 bzw. 12 Monaten zeigte sich hier eine leichte Kapselbildung um den Kleber, der jedoch in seiner Flexibilität und Homogenität konstant geblieben war. Stenosen oder aneurysmatische Formationen wurden mittels einer Angiographie ausgeschlossen. Histologisch konnte auch eine entzündliche Reaktion nicht festgestellt werden.

1.4 Ziel der Untersuchung

In der vorliegenden Studie soll anhand eines sensitiven Tiermodells das Langzeitverhalten des Klebstoffs Bioglue, der auf Grund seiner positiv zu bewertenden Vorversuche für die minimal-invasive koronare Gefäßanastomosierung geeignet scheint, untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf den möglichen morphologischen und histologischen Veränderungen als Reaktion auf den Kleber.

2. Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelles Modell

Das Versuchsvorhaben wurde von der Bezirksregierung Köln genehmigt und unter dem Aktenzeichen 203.2-BN,23/00 registriert.

Die Grundlage für das eigens entwickelte operative Design, das zuvor noch nicht publiziert wurde, bildet das bereits erfolgreich angewandte tierexperimentelle Modell von Oiwa et al. (2001). Oiwa et al. fertigten mittels GRF-Kleber End-zu-End-Anastomosen an der Arteria carotis und Arteria femoralis von Hunden. Hierbei schnitten sie ein ca. 4 cm großes Arterienstück heraus, führten vom distalen Ende dieses Stückes einen Ballonkatheter ein und adaptierten die proximal zu anastomosierenden Schnittenden. Anschließend wurde der Ballonkatheter über die

Anastomosenstelle nach cranial vorgeschoben und zur Fixierung der Anastomosenstelle aufgeblasen bzw. entfaltet. Nun erfolgte die zirkuläre Kleberapplikation. Auf den noch nicht ausgehärteten Kleber legten Oiwa et al. zur Verstärkung der Anastomosenstelle ein zirkuläres Kollagenpatch. Die distale Anastomose erfolgte in fortlaufender Gefäßnaht. Nach 12 Wochen wurden die Anastomosen entnommen und auf histopathologische Veränderungen mikroskopisch untersucht.

Die hier verwendete Ballonkathetertechnik zum Kleben (GRF-Kleber) von End-zu-End- Anastomosen an der Arteria carotis und Arteria femoralis von Hunden konnte übernommen und für die Ansprüche dieses tierexperimentellen Modells modifiziert werden.

Im Gegensatz zu Oiwa et al. erfolgt in dieser Studie die einfache Durchtrennung der Arteria carotis. Der Ballonkatheter wird über die Arteria carotis externa eingeführt und retrograd über die Carotisbifurkation und den Anastomosenspalt vorgeschoben. Der Einsatz von zwei fixen Haltenähten an den zu anastomosierenden Gefäßstümpfen, sowie das Aufblasen bzw. Entfalten des Ballons sorgen für eine exakte Fixation der Anastomose, welche anschließend mittels Bioglue geklebt wird. Auf ein zirkuläres Kollagenpatch wird in dieser Studie verzichtet. Die Einstichstelle des Ballonkatheters wird anschließend mittels einer kleinen Gefäßnaht verschlossen.

2.1.1 Studiendesign

Um ein möglichst objektives, qualitativ präzises und quantitativ aussagefähiges Ergebnis der Langzeituntersuchung nach einer Überlebensdauer von 60 Tagen zu gewährleisten, wurde ein Modell mit drei Gruppen gewählt. Diese drei Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer intraoperativen Behandlungsmethode und dienen dem Ausschluss möglicher Störgrößen, die das Ergebnis verfälschen könnten.

Die erste Gruppe (Gruppe: Kleber „K“) wird durch die geklebten End-zu-End-Anastomosen gebildet. Im Ergebnis spiegeln sich sowohl die Reaktionen des Gefäßes auf den Kleber, als auch die Auswirkungen der intraoperativen Manipulation sowie der Einsatz des Ballonkatheters wider.

Um die alleinige Reaktion des Gefäßes auf den Kleber beurteilen zu können, wird in

der zweiten Gruppe (Gruppe: Kleber auf Nativ „KN“) Bioglue auf die native Arteria carotis communis appliziert. Das Gefäß erhält keine weitere Manipulation, wodurch die intraoperativen Einflussfaktoren wie Gefäßdurchtrennung, Balloneinführung und Adaptation der Gefäßstümpfe vor Klebung entfallen.

Die dritte Gruppe (Gruppe: Nativ „N“) setzt sich aus den nativen, nicht manipulierten Carotiden zusammen. Diese Kontrollgruppe erleichtert vor allem den späteren mikroskopischen Vergleich zwischen physiologischen und eventuell pathologischen Gefäßwandveränderungen der Proben.

Es ist zu erwähnen, dass drei Anastomosen in Vorversuchen mit fortlaufender Suture genäht wurden. Aufgrund von technischen Problemen und postoperativen Komplikationen wie Stenosen oder Thrombenbildung mit Gefäßokklusion wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

2.1.2 Versuchstiere

Für das tierexperimentelle Modell wurden weibliche, 3,5 - 5 kg schwere bzw. 15 - 20 Wochen alte Kaninchen der Rasse „New Zealand White Rabbit“¹ verwendet.

Insgesamt wurden 17 Kaninchen (34 Carotiden) operiert. Davon entfallen 13 Anastomosen auf die Gruppe „K“, 9 Gefäße auf die Gruppe „KN“ und 9 Carotiden auf die Gruppe „N“.

Die Wahl der Tierart fiel aus folgenden Gründen auf das Kaninchen: Erstens sind die Größenverhältnisse, wie Durchmesser, Wanddicke und Wandbeschaffenheit der Arteria carotis des Kaninchens einer menschlichen Koronarie ähnlich, zweitens kann bei diesem Gefäßeingriff auf die belastende Thorakotomie und Beatmung verzichtet werden, was eine Reduzierung der Fremdeinflüsse für das Tier bedeutet. Weiter bietet die anatomische Lage der Arteria carotis externa einen Zugangsweg für die unter 2.1.5.1 erläuterte Ballonkathetertechnik. Das Herausschneiden eines Gefäßstückes und die anschließende Naht proximal der geklebten Anastomosenstelle wie es bei Oiwa et al. (2001) praktiziert wurde, entfällt. Risiken, wie die Fragilität des Gefäßes, Stenosen und Thrombenbildung nahe der Klebeanastomose, die durch die Gefäßnaht verursacht werden können, werden

¹ Kaninchenzucht: Fa. Lamers, Euskirchen

somit minimiert.

Einen weiteren wichtigen Aspekt bietet der an Kaninchen breit erforschte Atherosklerosepathomechanismus. Er ist dem des Menschen sehr ähnlich und verläuft wie beim Menschen spontan (Narayanaswamy et al. 2000, Antischkow 1914, Schenck et al. 1966, Vessilionovitch 1988). Mögliche Rückschlüsse können somit über das histopathologische Langzeitverhalten des Klebers unter humanen atherosklerotischen Bedingungen getroffen werden.

Die Kaninchen wurden einzeln in Standard- Tierboxen (60×60 cm) gehalten. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Standardfutter und Wasser. Vor der Operation blieben die Tiere ca. 3 Stunden nüchtern. Zu jeder Zeit standen die Kaninchen unter Beobachtung des Tierschutzbeauftragten Dr. med. vet. Eichelkraut (Universitätsklinik Bonn).

2.1.3 Anatomie der Versuchstiere

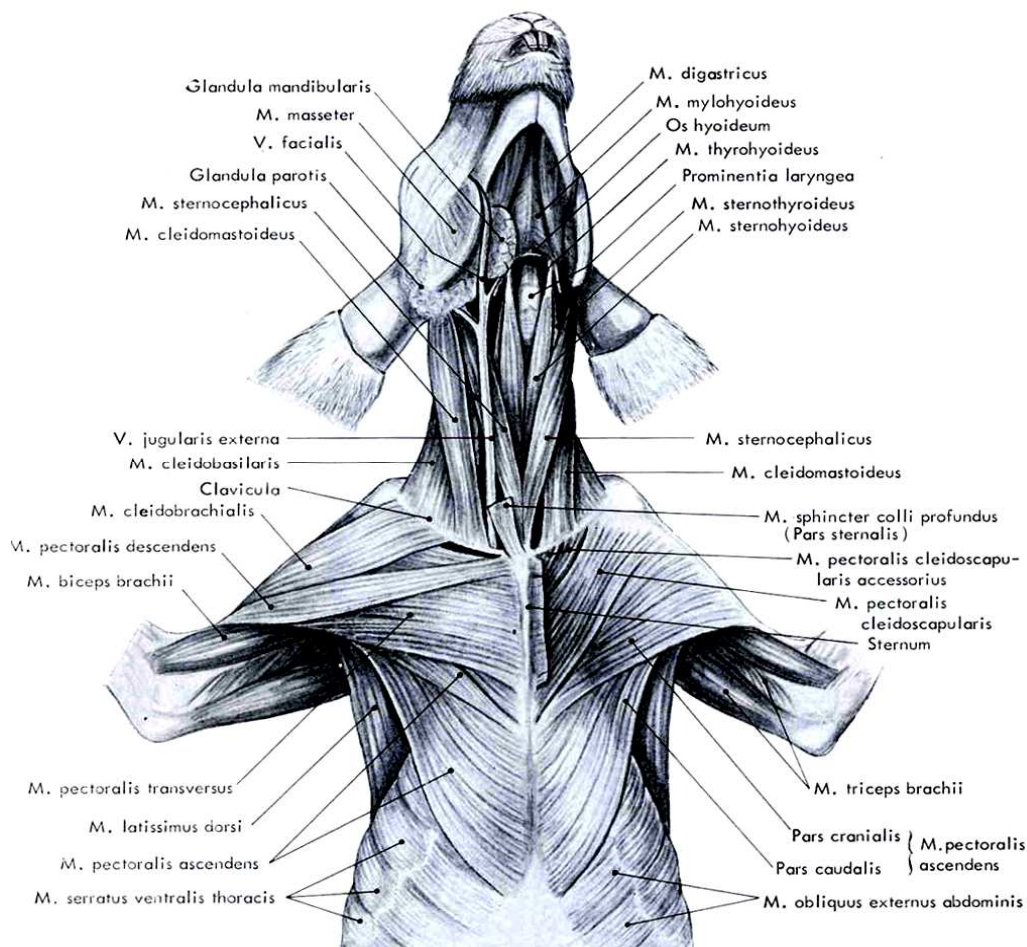


Abb.1: Anatomische Darstellung der Halspartie eines Kaninchens von ventral (Barone et al. 1973)

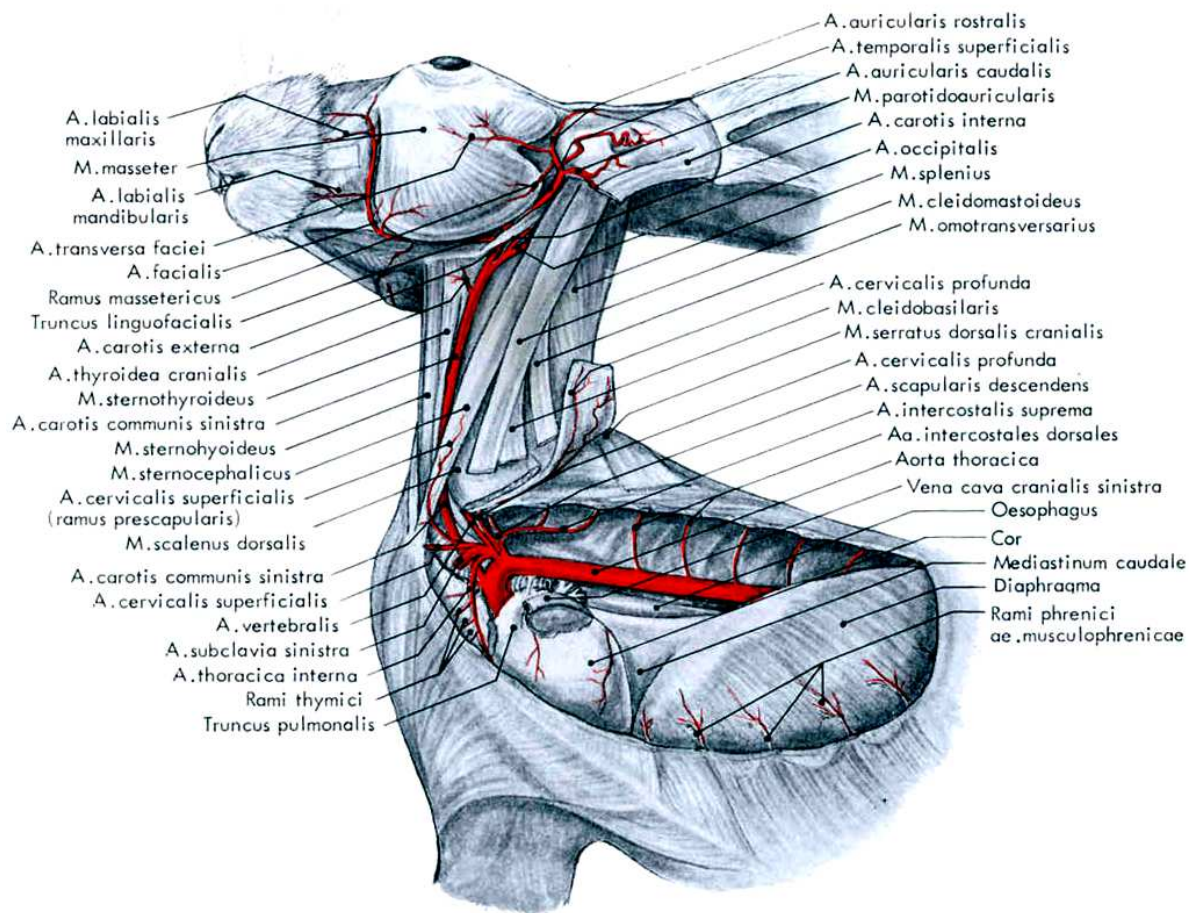


Abb.2: Anatomische Darstellung des arteriellen Gefäßsystems des Kaninchens von lateral (Barone et al. 1973)

2.1.4 Anästhesie

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch eine intramuskuläre Injektion einer Mischung aus Ketaminhydrochlorid² 40mg/ kg KG und Xylazinhydrochlorid³ 4mg/ kg KG.

Danach wurde über einen venösen Zugang⁴ (Größe 22G1) einer Ohrvene die Narkose mittels eines Gemisches aus 6,5 ml Ketaminhydrochlorid¹, 2 ml Xylazinhydrochlorid² und 16,5 ml 0,9% NaCl-Lösung⁵ aufrecht erhalten.

Entsprechend dem Narkoseverhalten des einzelnen Tieres wurde die Dosierung der

² Ketavet 100mg/ml, Pharmacia GmbH, Erlangen

³ Rompun 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen

⁴ Braunüle 22G1, Fa.B.Braun, Melsungen

⁵ NaCl 0,9%, Fresenius AG, Bad Homburg

intravenösen Narkose mittels eines Perfusors⁶ zwischen 0,03 – 0,07 ml/ min individuell abgestimmt.

Während der kompletten Narkose wurde jedes Tier mittels Pulsoxymeter⁷ überwacht und ggf. mit Sauerstoff per Inhalation versorgt.

Jedes Kaninchen erhielt bei Narkoseeinleitung 1,5 ml Infektionsprophylaxe Borgal⁸ (Trimethoprim/ Sulfadoxin).

2.1.5 Operationstechnik

2.1.5.1 Klebeanastomosen

Die narkotisierten Kaninchen werden ventral im Bereich des Halses vom Unterkiefer bis ca. 2-3 cm über die obere Thoraxapertur hinaus erst grob enthaart und schließlich mittels eines Einmalrasierers⁹ rasiert. Anschließend werden sie auf einem Heizkissen auf dem Operationstisch rücklings gelagert und an den Extremitäten fixiert. Der Hals des Kaninchens wird zusätzlich durch eine Nackenrolle stabilisiert.

Nach gründlicher Hautdesinfektion mit Prividon Iod¹⁰ und sterilem Abdecken des Operationsgebietes erfolgt der Hautschnitt durch eine mediane Längsinzision von Höhe des Kieferwinkels bis zum Jugulum. Das Platysma wird nun eröffnet und zu beiden Seiten nach lateral mobilisiert und durch Klemmen fixiert. Die nun sichtbar werdenden Muskeln M. sternocephalicus, M. sternohyoideus und M.

sternothyroideus werden dargestellt und jeweils mittels eines Mersilene 0/0 Fadens¹¹ umschlungen und an den Seiten fixiert. In das durch die Muskeln sternothyroideus und sternocephalicus aufgespannte Dreieck wird nun in die Tiefe präpariert und die Arteria carotis communis aufgesucht. Die Freilegung des Gefäßes erfolgt von distal auf Höhe des Sternalrandes nach proximal bis zum Angulus mandibularis, wo nach lateral die Arteria carotis externa abgeht. Die Arteria carotis externa wird zusätzlich ein Stück weiter nach cranial präpariert. Anschließend wird das Gefäß aus dem Bindegewebsstrang, in dem auch der Nervus vagus verläuft, befreit und die Adventitia leicht abpräpariert, ohne das Gefäß selbst mit der Pinzette anzufassen

⁶ Perfusor segura, Fa.B.Braun, Melsungen

⁷ Pulsoxymeter: Symphonie N-3000, Fa. Nellcor

⁸ Borgal 7,5% ad us. Vet., Intervet, Unterschleißheim

⁹ Einmalrasierer, Fa.B.Braun, Melsungen

¹⁰ Bétaisodonna, Fa.Mundipharma GmbH, Limburg (Lahn)

¹¹ Mersilene 0/0 Sutupak, Fa.Johnson&Johnson, Brüssel, Belgien

(Abb.3). Danach wird das Kaninchen durch die Gabe von 200 I.E./ kg KG Heparin¹² antikoaguliert, und es erfolgt die Querklemmung der Arteria carotis interna, distalen externa und der Arteria carotis communis im proximalen Drittel mittels atraumatischen Gefäßklemmen bzw. Schlingen.

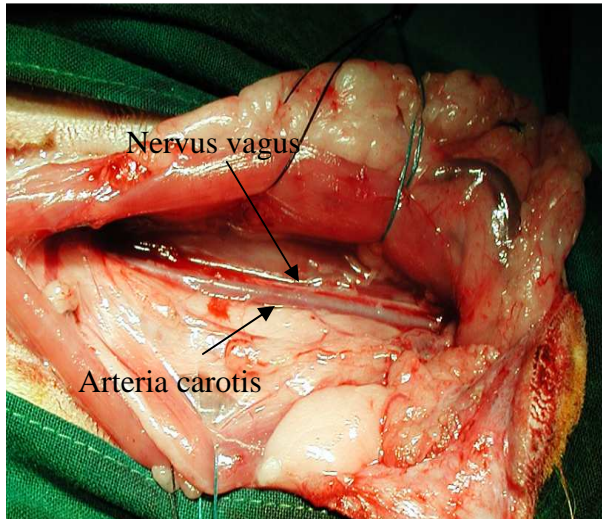


Abb.3: Freigelegte Arteria carotis



Abb.4: Querklemmung bzw. Anschlingen der Arteria carotis externa

Mit einer Mikropinzette wird die Arteria carotis externa angehoben (Abb.4) und distal der Querklemmung mit einer Mikroschere ventral zur Hälfte quer eingeschnitten. Über diese Öffnung wird nun ein Ballonkatheter¹³ mit 1,5 – 2,5 mm Durchmesser bis ca. 1 cm über die Carotisbifurkation nach distal eingeführt. Anschließend erfolgt die Durchtrennung der Arteria carotis communis im mittleren Gefäßabschnitt (Abb.5).

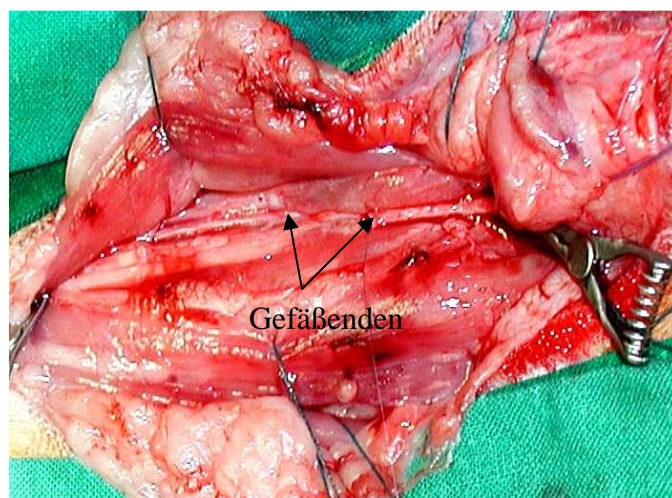


Abb.5: A. carotis nach medialer Teilung

¹² Liquemin N 20000, Hoffmann-La-Roche AG, Grenzach-Wyhlen

¹³ Ballonkatheter, Modell „Pleon“, Fa. Biotronik, Berlin

Die Gefäßstümpfe werden durch zwei gegenüberliegende Prolene¹⁴ 8/0 Haltefäden mit der jeweiligen Gegenseite verbunden. Der Ballonkatheter wird über die Anastomosenstelle hinaus in das Lumen des caudalen Arteria carotis- Gefäßstumpfes vorgeschoben und langsam entfaltet. Durch den moderaten Zug der überkreuzenden Haltefäden und durch das langsame Entfalten des Ballonkatheters wird die End-zu-End- Anastomose mit den kontaktierenden Gefäßstümpfen schließlich fixiert. Zusätzlich wird eine Haltevorrichtung, die weit entfernt vom distalen bzw. proximalen Gefäßstumpf positioniert wird, angebracht (Abb.6). Sie garantiert eine weitere Fixation der zu anastomosierenden Gefäßenden. Aufgrund der guten Elastizität der Arteria carotis lassen sich die Gefäßstümpfe sehr leicht adaptieren bzw. fixieren.

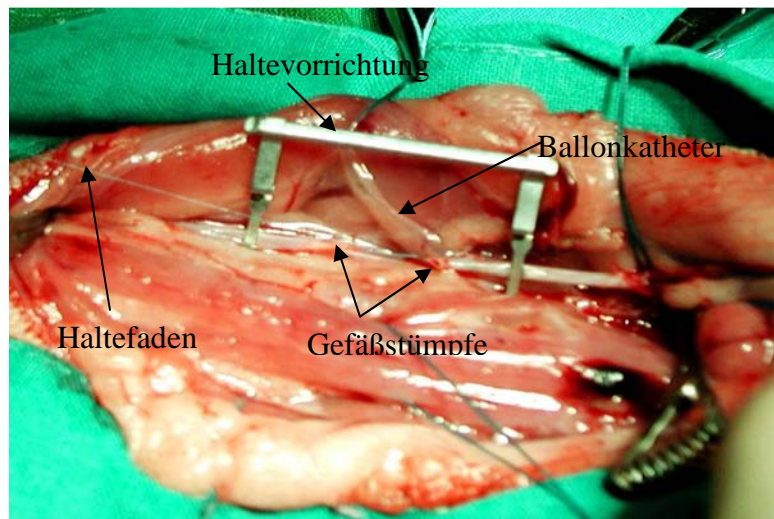


Abb.6: Eingeführter Ballonkatheter, zur Demonstration aus dem Anastomosenbereich herausgeschoben

Abhängig vom jeweiligen Gefäßdurchmesser wird der Ballonkatheter bis zum Erreichen des Zieldurchmessers dilatiert, um eine mögliche Schädigung des Endothels und anderer Wandschichtungen zu vermeiden. Ein 1,5 cm breites und 2,5 cm langes vorgefertigtes Aluförmchen wird unter die fixierte Anastomose gelegt. Zwei 3 mm breite Gummiringe werden eröffnet und im Abstand von 0,5 cm proximal und distal der Anastomosenstelle zirkulär um das Gefäß gelegt, wobei sie der Aluminiumfolie aufliegen. Diese Vorrichtung ermöglicht ein lokal begrenztes Auftragen des Klebers. Die sterile Spitze wird nun am Klebermodul befestigt.

¹⁴ Prolene 8/0 Nahtmaterial, Ethicon, Fa.Johnson&Johnson, Brüssel, Belgien

Nachdem man ca. 1-2 ml des blasenfreien Klebers auf eine sterile Komresse¹⁵ vorgespritzt hat, wird Bioglue mit einer Dicke von 2-3 mm in die Form auf die Anastomose aufgetragen. Nach einer Durchhärtungszeit von ca. 2-3 min. wird der Ballonkatheter durch das Lumen mit NaCl-Lösung angespült und über Sog zusammengefalzt. Die Aluminiumfolie und die zwei Gummiringe werden vorsichtig mit einer feinen Pinzette vom Kleber abgelöst. Nach Entfernen des Ballonkatheters wird die Schnitinzision an der A. carotis externa nach vorheriger Entlüftung durch eine fortlaufende Naht mit Prolene 8/0-Faden verschlossen. Die Querklemmungen werden schließlich wieder aufgehoben. Die Offenheit der Anastomose wird durch eine einmalige Flußmessung distal und proximal der Kleberapplikationsstelle kontrolliert (Abb.7).

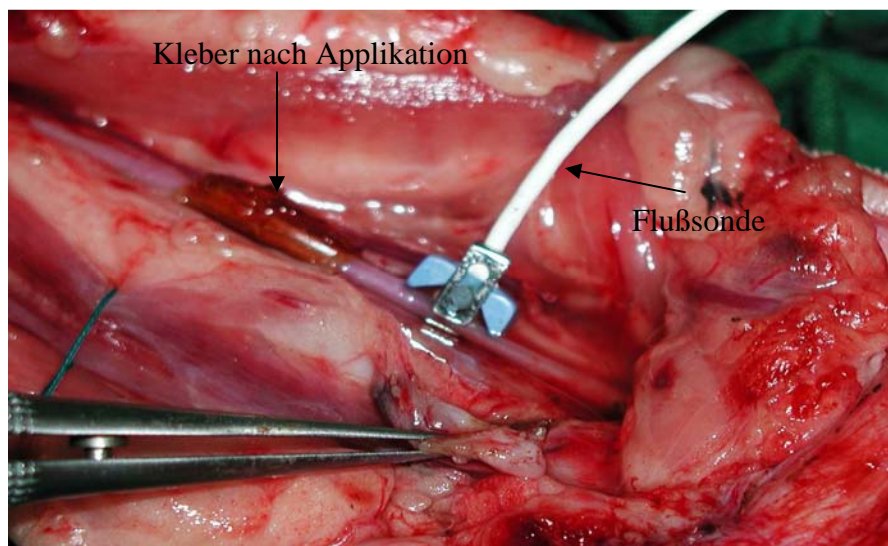


Abb.7: A. carotis nach Kleberapplikation, Prüfung der Durchgängigkeit

Die eröffneten Gebiete werden anschließend durch eine fortlaufende Fasziennaht mit Vicryl¹⁶ 3/0, danach die Haut mit Prolene¹⁷ 3/0 in Einzelknöpfen verschlossen. Nach Beendigung der Narkose verbleiben die Kaninchen ca. 60 Tage in ihren Stallungen.

¹⁵ Mullkompressen 10×20 cm, NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. CoKG, Wetter

¹⁶ Vicryl 3/0 Nahtmaterial, Ethicon, Fa.Johnson&Johnson, Brüssel, Belgien

¹⁷ Prolene 3/0 Nahtmaterial, Ethicon, Fa.Johnson&Johnson, Brüssel, Belgien

2.1.5.2 Kleber auf ein natives Gefäßstück

Wie bereits unter 2.1.5.1 ausgeführt, wird zuerst ein operativer Zugang zur Arteria carotis communis geschaffen. Im Gegensatz zu der weiteren Darstellung des Gefäßes bei der Behandlung von Klebeanastomosen findet hier lediglich die Präparation und Darstellung der Arteria carotis communis von der Höhe des Sternalrandes bis zur distal gelegenen Bifurkation der A. carotis communis statt. Es kann auf eine Freilegung der Arteria carotis externa und interna verzichtet werden, da bei der Applikation von Kleber auf ein natives Gefäßstück (KN) weder eine Querklemmung, noch ein Zugangsweg für den stabilisierenden Ballonkatheter benötigt wird.

Die Arteria carotis communis wird nach erfolgter Darstellung aus dem Bindegewebsstrang zum Nervus vagus vorsichtig herausgelöst und von anheftendem Bindegewebe befreit. Das Gefäß liegt nun nativ und pulsatil in situ. Nach Befestigung der sterilen Spitze am Applikatormodul und nach Vorspritzen von 1-2 ml blasenfreiem Kleber, wird auf die ventrale Seite des Gefäßes in der Mitte zwischen Bifurkation und Sternalrand eine ca. 1,5 cm lange und 2,5 mm breite Kleberschicht aufgetragen, die maximal um die halbe Zirkumferenz des Gefäßes reicht. Die Dicke des Klebers beträgt ca. 2-3 mm. Nach einer Aushärtezeit von 2-3 Minuten werden die eröffneten Gebiete wie in Kapitel 2.1.5.1 beschrieben, verschlossen. Anschließend verbringen die Tiere 60 Tage in ihren Stallungen.

2.1.5.3 Kontrollgruppe

Die Arteria carotis communis wird nach dem Schema, welches unter 2.1.5.2 dargelegt wurde, präpariert. Das Gefäß erfährt keine weitere Manipulation, sondern wird nativ und ohne Kleber in situ belassen. Der Wundverschluß erfolgt wie unter 2.1.5.1 beschrieben.

Wie alle anderen Tiere verbringen sie schließlich ca. 60 Tage in ihren Stallungen.

2.2 Untersuchungsmethodik

Um eine möglichst detaillierte Aussage über das histopathologische und morphologische Langzeitverhalten von Bioglue, bzw. der geklebten Anastomosen zu treffen, wurden nach 60 Tagen angiographische, makroskopische, histologische und immunhistologische Untersuchungstechniken ausgewählt.

2.2.1 Angiographische Untersuchung

Anhand dieser Untersuchungsmethode soll in zwei Ebenen festgestellt werden, ob die jeweiligen Gefäße frei durchgängig sind, oder sich Stenosen gebildet haben (Leclerc 1995). Eventuell sichtbare Stenosen können mittels der Stenosegradeinteilung, die im „European Carotid Surgery Trial“ (ECST, 1991) verwendet wurde, quantifiziert werden. Hierbei wird der verbliebene Gefäßdurchmesser im Bereich der Stenose (in mm) mit dem Gefäßdurchmesser der Arteria carotis proximal der Stenose (in mm) verglichen und die prozentuale Gefäßeinengung errechnet. Die Stenose (in %) wird dann einem Grad von 1 (normal) bis 5 (verschlossen) zugeordnet (Tab.2).

Ein weiteres Kriterium ist eine mögliche Aneurysma- und Abszessausbildung, die bei der Durchleuchtung im Rahmen der angiographischen Untersuchung sichtbar würde.

Gefäßeinengung in %	Grad	Bewertung der Stenose
0	1	normal
1-29	2	mild
30-69	3	moderat
70-99	4	schwer
100	5	verschlossen

Tab.2: DSA ermittelte Stenosegradeinteilung der ECST-Studie (1991)

2.2.1.1 Vorbereitung der Angiographie

Nach einer Stallzeit von 60 Tagen werden die Kaninchen zuerst durch intramuskuläre, dann durch eine intravenöse Anästhesie (Kapitel 2.1.4) narkotisiert. Die Enthaarung findet im Bereich der Leiste und des Halses statt, was für die spätere Probenentnahme von Vorteil ist. Nachdem das Kaninchen rücklings auf einem Operationstisch gelagert und an den Extremitäten fixiert wurde, erfolgt die ca. 4 cm lange, mediane Längsinzision im Bereich der Leiste. Die Arteria femoralis wird nun aufgesucht und in der Länge des Hautschnitts dargestellt. Mittels einer Braunüle¹⁸ (Größe 18 G) wird die Arteria femoralis im mittleren freigelegten Drittel punktiert. Die Hohnadel der Braunüle wird anschließend entfernt und ein Führungsdraht über diese in das Lumen der Arteria femoralis eingeführt und ca. 4-5 cm vorgeschoben. Jetzt wird die Braunüle über den Führungsdraht, der durch die Kompression mittels sterilem Tupfer¹⁹ in seiner Lage fixiert wird, entfernt. Über den Führungsdraht wird nun eine Schleuse²⁰ (5 Fr.) in das Gefäß eingebracht und mittels Prolene²¹ 3/0-Faden fixiert (Seldinger-Technik). Die Haut wird anschließend mit einem Prolene²² 2/0-Faden verschlossen, was einen zusätzlichen Halt der Schleuse verspricht.

2.2.1.2 Angiographietechnik

Die digitale Subtraktionsangiographie (DSA)²³ wurde in der Radiologischen Klinik der Universitätsklinik Bonn unter kontinuierlicher Narkose mit einem Gemisch aus Ketaminhydrochlorid, Xylazinhydrochlorid und NaCl über einen Perfusor (Kapitel 2.1.4) durchgeführt.

Über die in der Arteria femoralis liegende Schleuse (Kapitel 2.2.1.1) wird ein Führungsdraht eingeführt. Unter Durchleuchtung wird dieser über die Aorta in die Arteria carotis communis sinister bzw. dextra vorgeschoben und dort belassen. Unter erneuter Durchleuchtung wird anschließend ein Angiographiekatheter²⁴ (Fr. 4) über den Führungsdraht bis zum proximalen Anteil der Arteria carotis communis

¹⁸ Braunüle 18 G, Optiva 2, Fa. Ethicon S.p.a., Pomezia, Italien

¹⁹ Pagasling No.3, Paul Hoffmann AG, Heidenheim

²⁰ Schleuse: Radiofocus Introducer II, 5 Fr., Fa. Terumo, Leuven, Belgien

²¹ Prolene 3/0 Nahtmaterial, Ethicon, Fa. Johnson&Johnson, Brüssel, Belgien

²² Prolene 2/0 Nahtmaterial, Ethicon, Fa. Johnson&Johnson, Brüssel, Belgien

²³ DSA Gerät: Multistar T.O.P., Fa. Siemens

²⁴ Angiographiekatheter: Judkins 4 Fr., Fa. Cordis, Haan

vorgeschoben. Nachdem der Führungsdraht entfernt wurde, erfolgt unter Injektion von 4-5 ml eines nichtionischen Kontrastmittels²⁵ die Aufnahme der digitalen Subtraktionsangiographie in zwei Ebenen.

Nach Beendigung der Angiographie wurden die Tiere in Narkose durch eine intravenöse Überdosis von 10 ml Barbiturat²⁶ euthanasiert, die Proben entnommen und in 4% Formalin fixiert.

2.2.1.3 Angiographische Anatomie

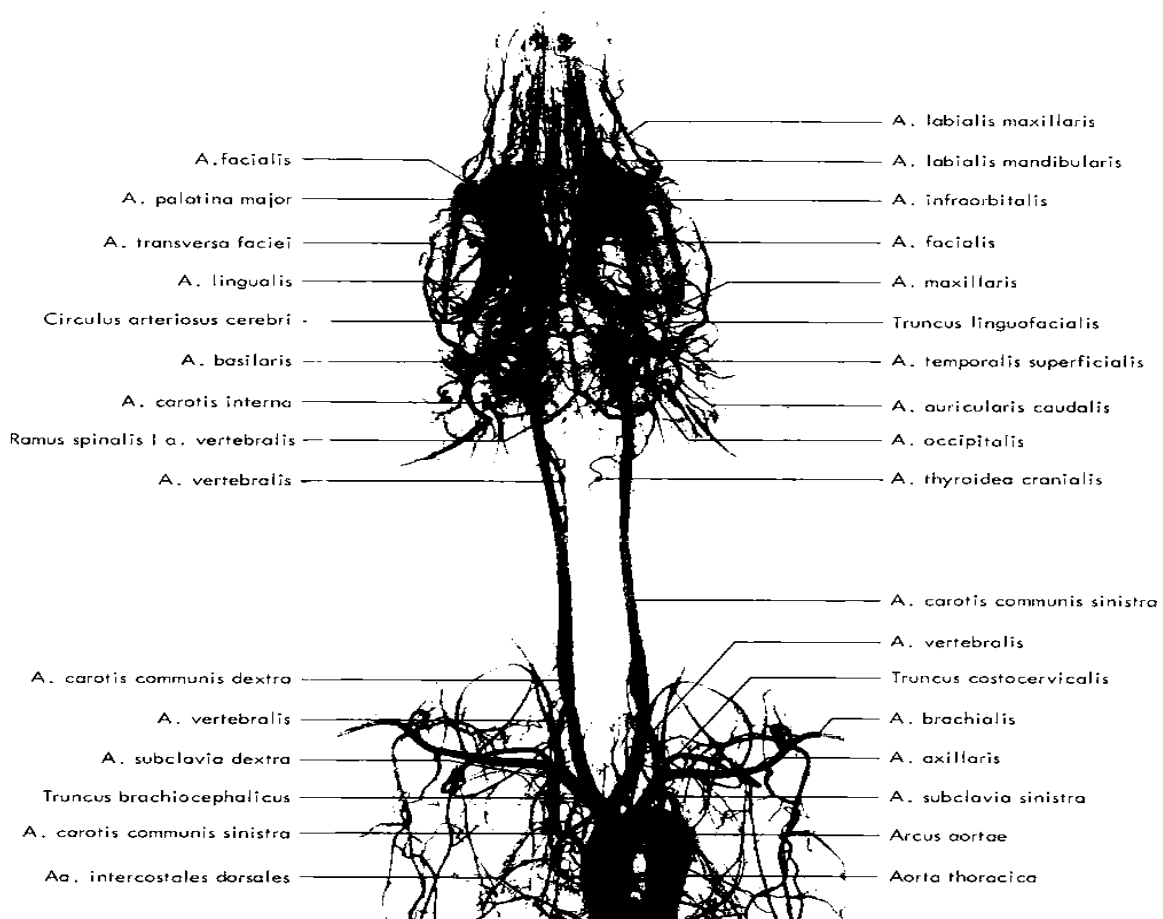


Abb.8: Darstellung der angiographischen Anatomie eines Kaninchens (Barone et al. 1973)
(Beide Aa. carotis entspringen i.d.R. zusammen mit der A. suclavia dextra aus einem gemeinsamen Truncus brachiocephalicus)

²⁵ Kontrastmittel: Imperon 150, Fa. Bracco-Byk-Gulden, Konstanz

²⁶ T 61, Fa. Hoechst Veterinär Co.

2.2.2 Makroskopische Untersuchung

Die makroskopische Untersuchung umfasst zum einen Auffälligkeiten, die sich bei der Präparation der Proben ergeben haben, zum anderen die Betrachtung von Photographien²⁷ jeder Carotide, die im Photolabor der Universitätsklinik Bonn angefertigt wurden. Ein besonderes Augenmerk richtet sich hier auf eine mögliche Kapselbildung um den Kleber und auf die Homogenität und Festigkeit des Klebers. Weiter wird beurteilt, ob mögliche Verkalkungen, Thromben, Stenosen oder Abszesse bereits makroskopisch sichtbar sind. Bei den End-zu-End-Klebeanastomosen bildet die Spaltgröße zwischen den beiden geklebten Gefäßenden einen weiteren wichtigen Aspekt, den es zu untersuchen gilt.

2.2.3 Histologische Untersuchung

Die zuerst in Formalin fixierten und danach in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden in einer Dicke von 3-4 µm geschnitten²⁸, gefärbt und bei 40- bis 1000-facher Vergrößerung²⁹ im Mikroskop³⁰ betrachtet und mittels Digitalkamera²⁷ abphotografiert. Die Auswertung erfolgte dann am Bildschirm.

Die zur Übersichtshistologie mit Hämatoxylin- Eosin angefärbten Präparate geben vor allem den histopathologischen Aspekt der Beziehung von Kleber zu Gefäßwand und Gewebe wieder. Wichtige Merkmale sind hierbei eine mögliche Kapselbildung, eventuelle Abbauvorgänge am Kleber und ihre Lokalisation sowie eine fragliche Verkalkung der Gefäßwand bzw. des Gewebes. (siehe Tab.3 und Abb. 33)

Kalkvorkommen	Kleberabbau	Endothelstatus
0= kein Kalk	0= homogen erhalten	a= durchgehend
1= Adventitia & Media	1a= Kleber-Kapsel-Übergang	b= zerstört
2= Media & Intima	1b= Kleber-Gefäß-Übergang	c= gestückelt
3= Intima	2= Gefäß-Kleber-Kapsel-Übergang	
4= Kapsel		

Tab.3: Gradeinteilung bei der Untersuchung von Kalkvorkommen, Lokalisation von Kleberabbau und Endothelstatus mittels H.E.-Färbung

²⁷ Digitalkamera C3030, Fa. Olympus, Hamburg

²⁸ Schlittenmikrotom, Typ SM 2000R, Fa. Leica, Bensheim

²⁹ Planobjektiv 4x / 10x, Fluoridobjektiv 40x/ 100x, Fa. Olympus, Hamburg

³⁰ Olympus BX 41, Fa. Olympus, Hamburg

Von weiterem Interesse sind die Beschaffenheit des Endothels und eine mögliche Entzündungsreaktion mit der Differenzierung ihrer Entzündungszellen. Bei der Beurteilung der Quantität des jeweiligen Entzündungszelltyps wird das Ausmaß seines Vorkommens bei 1000-facher Vergrößerung an mehreren Stellen der Entzündungsreaktion beurteilt. Füllt die Anzahl eines Entzündungszelltyps ein Blickfeld mengenmäßig aus, so entspricht dies einem häufigen Vorkommen. Sind dagegen nur 2-3 Entzündungszellen eines Typs sichtbar, so entspricht dies dem Stadium „wenig“. (siehe Tab.4 und Abb.9,10,11)

Granulozyten	Makrophagen	Histiozyten	Riesenzellen/ Granulomzellen
a) viel	a) viel	a) viel	a) viel
b) mäßig	b) mäßig	b) mäßig	b) mäßig
c) wenig	c) wenig	c) wenig	c) wenig

Tab.4: Gradeinteilung der Quantität von Entzündungszellen bei H.E. gefärbten Präparaten

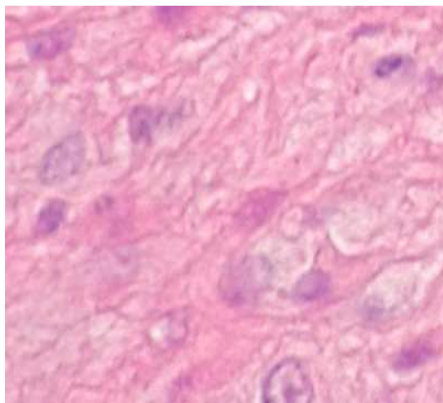
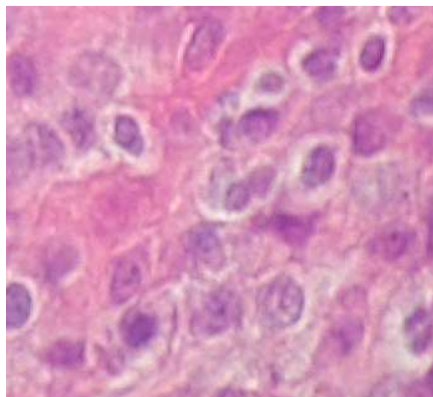


Abb.9: Wenige Entzündungszellen
H.E.- Färbung, x 1000



Abb.10: Mäßig viele Entzündungszellen
H.E.- Färbung, x 1000

Abb.11:
Viele Entzündungs-
zellen, H.E.-Färbung
x 1000



Des weiteren wurde zur Identifikation der Entzündungszellen eine immunhistologische Färbung (MAC 387) von Makrophagen, Granulozyten und Histiozyten durchgeführt.

Einen weiteren Untersuchungsaspekt bildet die Frage einer möglichen Kollagenneogenese innerhalb der jeweiligen Gefäßschichten oder der Kapsel (Tab.5). Hierzu wurde eine Elastica van Gieson-Färbung angefertigt.

Kollagenneogenese
a) Neubildung innerhalb Kapsel
b) Neubildung innerhalb Gefäß
c) Neubildung innerh. Kapsel & Gefäß

Tab.5: Lokalisation der Kollagenneogenese mittels EvG-Färbung

Um atheromatöse Cholesterinplaques von mineralisierten (vor allem calciumphosphathaltigen) Kalkvorkommen zu unterscheiden, wurden die Präparate mittels der modifizierten Versilberung nach Kossa (Krutsay, 1963) angefärbt.

2.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin- Färbung

Färbeanleitung nach Romeis, modifiziert:

Ansetzen der individuellen Kernfarbe Hämatoxylin:

1 g Hämatoxylin³¹, 0,2 g NaJO₃³², 50 g Kalialaun³³, 50 g Chloralhydrat³⁴, 1 g Zitronensäure³⁵

werden mit 1000 ml Aqua dest. gemischt und anschließend filtriert.

Pro Küvette: 200 ml der angesetzten Hämatoxylin-Lösung + 2 ml Häkalaun nach Mayer³⁶.

³¹ Hämatoxylin kristallin, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

³² Natrium-Jodat, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

³³ Kalialaun, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

³⁴ Chloralhydrat, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

³⁵ Zitronensäure, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

³⁶ Mayers Häkalaunlösung, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

Färbevorgang:

- Entparaffinieren in Xylol³⁷ (3 × 10 min.)
- Entwässern in absteigender Alkoholreihe (100%,96%,90%,70%) (jeweils 5 min.)
- Spülen in Aqua dest. bis das Wasser klar abläuft
- Kernfärbung mit Hämatoxylin (5 min.)
- Wässern unter fließend warmem Wasser (5 min.)
- Plasmafärbung mit Eosin 0,5% wässrig³⁸ (1-2 min.)
- Kurz spülen in Aqua dest.
- Differenzieren in 70% Alkohol, danach 90% Alkohol (3-6 × eintauchen)
- Absteigende Alkoholreihe (100%,96%,90%,70%) (2 × 5 min.)
- Xylol (3 × 7 min.)
- Eindeckeln mit Entellan³⁹

2.2.3.2 Elastica van Gieson-Färbung nach Weigert

Färbearbeitung nach Testkit Sigma HT25-A: (Cullin et al. 1985, Sheehan et al. 1980, Thompson 1960, Lillie 1965)

Ansetzen der Elastin- Gebrauchslösung⁴⁰:

Hämatoxylin alk. 26 ml, Eisenchlorid- Lösung 3,9 ml, Weigert's Jodid 10, 4 ml, Aqua dest. 6,5 ml werden gut gemischt und in ein Coplin- Färbegefäß gegeben.

Ansetzen der Eisenchlorid- Gebrauchslösung⁴¹:

Eisenchlorid- Lösung 3,9 ml, Aqua dest. 48,1 ml werden gut gemischt und in ein Coplin Färbegefäß gegeben.

- Entparaffinieren in Xylol (3 × 10 min.)
- Absteigende Alkoholreihe (100%,96%,90%,70%) (jeweils 5 min.)
- Spülen in Aqua dest. (1 min.)

³⁷ Xylol, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

³⁸ Eosin G-Lösung 0,5% wässrig, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

³⁹ Entellan, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

⁴⁰ Testkit Sigma HT25-A, Fa. Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen

- Färbung mit Gebrauchslösung Elastin (10 min.)
- Spülen in Aqua dest. (1 min.)
- Differenzieren in Eisenchlorid- Gebrauchslösung (3 × eintauchen)
- Spülen mit Leitungswasser (1 min.)
- Spülen in 96% Alkohol (Isopropanol)⁴¹ (1 min.)
- Färbung mit van Gieson- Lösung⁴¹ (1-3 min.)
- Spülen mit 96% Alkohol (1-2 min.)
- Entwässern in 100% Alkohol (2-3 min.)
- Klären in Xylol (3 × 5 min.)
- Eindeckeln mit Entellan

2.2.3.3 Makrophagenantikörper MAC- 387

Färbung nach Brandtzaeg 1988, 1992 und Flavell et al. 1987.

1. Tag:

- Entparaffinieren mittels Xylolreihe (3 × 10 min.)
- Entwässern in absteigender Alkoholreihe (100%,96%,90%,70%) (jeweils 5 min.)
- Spülen mit Aqua dest. (5 min.)
- Proteolyse in Trypsin 0,1%⁴² (Mikrowelle bei 600 Watt, 10 min.)
- Spülen in Phosphatpuffer (PBS)⁴³ (3 × 5 min. bei Raumtemperatur)
- Fetales Kälber- Serum (FCS)⁴⁴ 1:25 (100µl FCS + 2400µl PBS) (Feuchte Kammer bei Raumtemperatur 30 min.)
- FCS abklopfen, nicht spülen
- Primär Antikörper= MAC 387⁴⁵ 1:100 (10µl AK + 990µl PBS) (Feuchte Kammer bei 4°C über Nacht)

⁴¹ Isopropanol zur Synthese, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

⁴² Trypsin, Fa. Biochrom, Berlin

⁴³ Natriumsalze für PBS-Puffer, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

⁴⁴ Fetales Kälber Serum, Fa. Biochrom, Berlin

⁴⁵ MAC 387 0,2mg/0,2ml, Fa. NatuTec Systeme GmbH, Frankfurt

2.Tag:

- Spülen in Trishydroxymethylaminomethan-Puffer (TRIS)⁴⁶ (3 × 5 min.)
- Brücken- Antikörper= Rabbit-Anti-Mouse-Ig 1:1000 (10µl AK + 990 µl TRIS)
(Feuchte Kammer bei 37°C 10 min.)
- Spülen mit TRIS (3 × 5 min bei Raumtemperatur)
- Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex (APAAP)⁴⁷ 1:50
(20µl APAAP + 980 µl TRIS) (Feuchte Kammer bei 37°C 10 min.)
- Spülen in TRIS (3 × 5 min.)
- Brücken- Antikörper 1:100 (Feuchte Kammer bei 37°C 10 min.)
- Spülen in TRIS (3 × 5 min.)
- APAAP-Komplex 1:50 (Feuchte Kammer bei 37°C 10 min .)
- Spülen in TRIS (3 × 5 min.)
- Fast Red⁴⁸ (10-20 min. bei Raumtemperatur in Dunkelheit)
- Spülen in Aqua dest. (5 min.)
- Gegenfärbung mit Hämalun (7 sec.)
- Fließend wässern (lauwarm, bis zu 5 min.)
- Eindeckeln mit Aquatex⁴⁹

2.2.3.4 Versilberung nach Kossa (Krutsay, 1963)

Färbearbeitung nach Romeis, 1989:

Ansetzen der Silbernitrat-Lösung:

5 g Silbernitrat⁵⁰ in 100 ml Aqua dest. lösen und im Dunkeln aufbewahren

Ansetzen der Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung:

5 g Natriumkarbonat⁵¹ in 25 ml 35-40%igem Formaldehyd (eventuell filtrieren) und 75 ml Aqua dest. lösen

⁴⁶ TRIS, Fa. Roth, Karlsruhe

⁴⁷ APAAP-Komplex (Mouse monoclonal), Fa. Biozol Diagnostica GmbH, Eching

⁴⁸ Fast Red Tablets, Fa. Serotec, England

⁴⁹ Aquatex, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

⁵⁰ Silbernitrat, Nr. 1512, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

⁵¹ Natriumkarbonat, Nr. 6392, wasserfrei, Fa. Merck KgaA, Darmstadt

Ansetzen der Natriumthiosulfat-Lösung:

5 g Natriumthiosulfat⁵² in 100 ml Aqua dest. lösen

- Entparaffinieren in Xylol (3 × 5 min.)
- Absteigende Alkoholreihe (100%,96%,90%,70%) (jeweils 5 min.)
- Färben in 5%iger wäßriger Silbernitrat-Lösung (30-60 min. im Dunkeln)
- Spülen in 3 Portionen Aqua dest.
- Reduzieren in Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung (2 min.)
- Fixieren in 5%iger Natriumthiosulfat-Lösung (5 min.)
- Gründlich wässern in Leitungswasser (5 - 15 min)
- Spülen in Aqua dest.
- Eindeckeln mit Entellan

3. Ergebnisse

Von den insgesamt 17 Kaninchen (34 Carotiden), die im Zuge des tierexperimentellen Modells operiert wurden, konnten 31 Proben erfasst und ausgewertet werden. 13 Proben konnten hiervon der Gruppe „Klebeanastomose“ (K) zugeordnet werden. Die durchschnittliche Überlebenszeit in dieser Gruppe lag bei 51 Tagen. Jeweils 9 Gefäße bilden die Gruppe „Kleber auf Nativ“ (KN) und „Nativ“ (N) , wobei in beiden Gruppen die durchschnittliche Überlebenszeit 60 Tage betrug. Es errechnet sich für die durchschnittliche Überlebenszeit aller Tiere ein Wert von $55,5 \pm 4,5$ Tagen. 3 Anastomosen bilden die Gruppe „EX“, welche in Vorversuchen in fortlaufender Suture genäht wurden. Auf Grund von technischen Problemen und postoperativen Komplikationen wie Stenosen und Thrombenbildung mit Gefäßokklusionen, wurde dieser Ansatz im Hinblick auf die zu kurze Überlebenszeit nicht weiter verfolgt (Tab.6). Alle Gefäße waren bei der intraoperativen Flussmessung durchgängig und pulsatil.

⁵² Natriumthiosulfat, Nr. 6509, Fa. Merck KGaA, Darmstadt

Probenanzahl insgesamt	34			
Gruppe	K	KN	N	EX
Anzahl n=	13	9	9	3
Mittlere Überlebenszeit Gruppentiere	51	60	60	4
Mittlere Überlebenszeit aller Tiere	55,5 ± 5,5			

Tab.6: Allgemeine Gruppenübersicht, Gruppe K=Klebeanastomosen, KN=Kleber auf Nativ, N=Nativ
EX=Vorversuchstiere in fortlaufender Suture

3.1 Angiographie

3.1.1 Stenosen

Von den 13 Klebeanastomosen der Gruppe K waren 3 von 13 (23,1%) Gefäße durchgängig, wovon *eine* Anastomose eine Stenose Grad 4 (Abb.14), *eine* Anastomose Grad 3 (Abb. 16) und *eine* Anastomose eine Stenose Grad 2 aufwiesen. Die übrigen 10 Klebeanastomosen (76,9%) waren verschlossen, was einem Stenosegrad 5 (Abb.15) entspricht. Bei der KN Gruppe (n=9) waren alle Gefäße durchgängig und wiesen zu 100 % eine milde Stenose (Grad 2) auf (Abb.13). Die Gefäße der Gruppe N (n=9) waren ebenfalls zu 100 % durchgängig und wiesen zu 100 % keine Stenosen (Grad 1) auf (Abb.12).

Gefäßeinengung in %	Grad	Gruppe K (n=13)	Gruppe KN (n=9)	Gruppe N (n=9)
0	1	0	0	9 (100%)
1-29	2	1 (7,7%)	9 (100%)	0
30-69	3	1 (7,7%)	0	0
70-99	4	1 (7,7%)	0	0
100	5	10 (76,9%)	0	0

Tab.7: Häufigkeit von Stenosen in den Gruppen K, KN und N

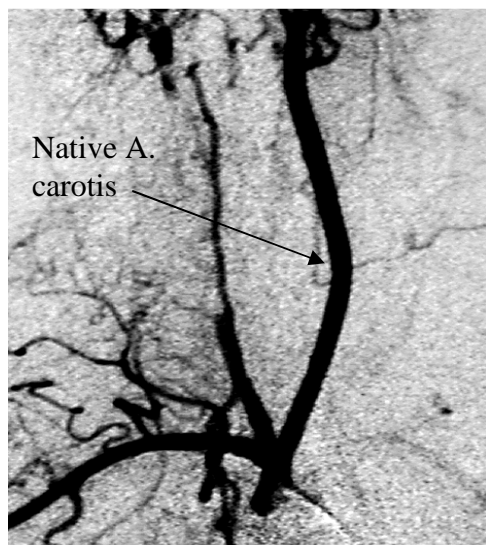


Abb.12: DSA-Angiographie, Stenose 1°
(Gruppe: N)

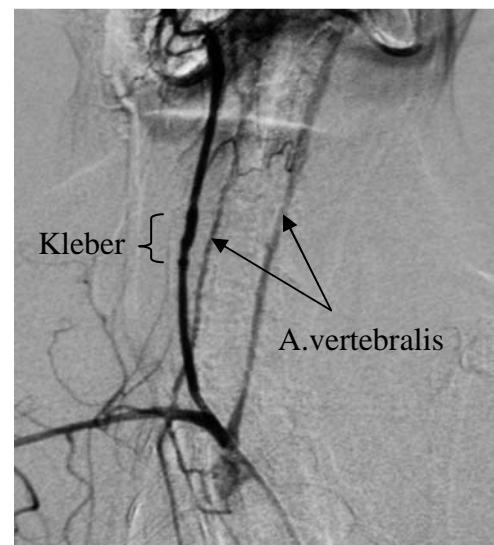


Abb.13: DSA-Angiographie, Stenose 2°
(Gruppe: KN)

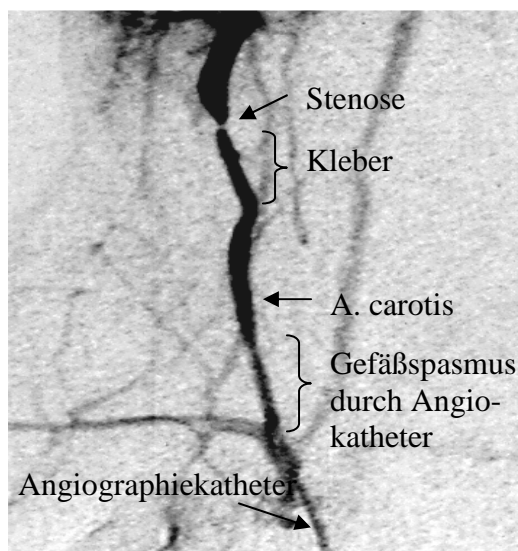


Abb.14: DSA-Angiographie, Stenose 4°
(Gruppe: K)

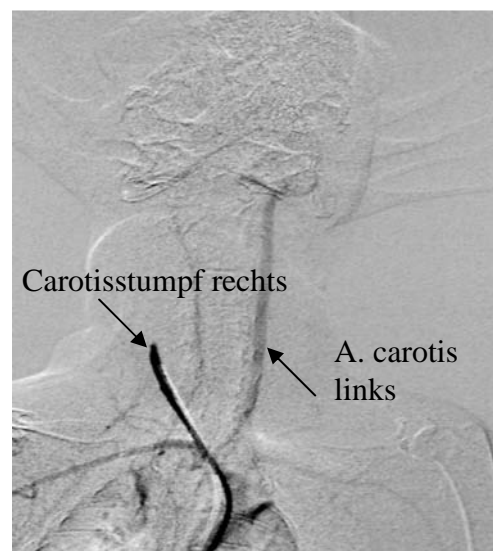


Abb.15: DSA-Angiographie, Stenose 5°
(Gruppe: K)

3.1.2 Aneurysmen

In der Gruppe K konnte bei 1/13 (7,7%) Klebeanastomosen ein Aneurysma angiographisch gesichert werden, welches gleichzeitig zu einer Stenose 3° führte. Bei den Gruppen KN und N waren keine Ausbildungen von Aneurysmen sichtbar.

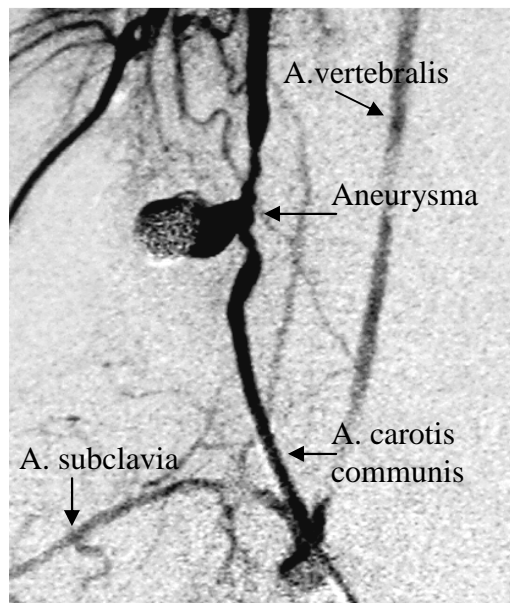


Abb.16: DSA-Angiographie, Aneurysma mit Stenose 3°, (Gruppe: K)

3.1.3 Abszessbildung

Bei 1/13 Tieren (7,7%) der Gruppe K konnte ein ca. 4 × 5 cm großer abgekapselter Abszess im Bereich der Klebeanastomose der Arteria carotis festgestellt werden. Der Abszess entwickelte sich akut innerhalb von 3 Tagen, nach einer Überlebenszeit von 60 Tagen. Bei den Gruppen KN und N konnte keine Abszessausbildung angiographisch bzw. bei Durchleuchtung nachgewiesen werden.

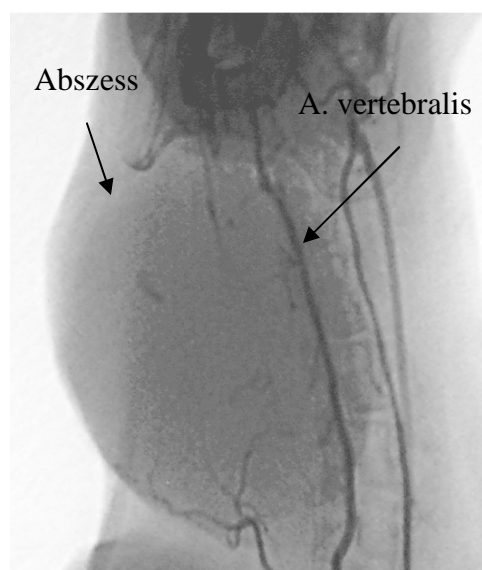


Abb. 17: DSA-Angiographie, Abszessbildung (Gruppe: K)

3.2 Makroskopie

3.2.1 Kapsel

Bereits bei der Probenentnahme der K- und KN- Gruppe fiel auf, dass sich bei allen Tieren dieser Gruppen während der postoperativen Phase ein sehr faserreiches Bindegewebe um die Arteria carotis, um die Kleberapplikationsstelle, gebildet hatte, was bei der Gruppe N hingegen nicht beobachtet werden konnte.

In der K- Gruppe bildeten hierzu 12/12 (100%) Tiere eine ca. 0,5 – 1,5 mm dicke, derbe Kapsel um die Anastomosenstelle aus (Abb.18). Bemerkenswert ist, dass die Kapsel die Kleberoberfläche komplett umgibt und nur dort vorkommt. Das gleiche Phänomen konnte bei 9/9 (100%) Tieren der KN- Gruppe festgestellt werden (Abb.19). In der N- Gruppe bildete sich dagegen bei keinem der Tiere eine Kapsel aus.

Bei *einem* Tier der K- Gruppe, welches den Abszess ausgebildet hatte, war die Arteria carotis zersetzt, bzw. nicht mehr auffindbar.

Gruppe	K (n=12)	KN (n=9)	N (n=9)
Kapselbildung	12 (100%)	9 (100%)	0 (0%)

Tab.8: Häufigkeit der Kapselbildung in den Gruppen K, KN und N



Abb.18: Kapselbildung in der Gruppe K

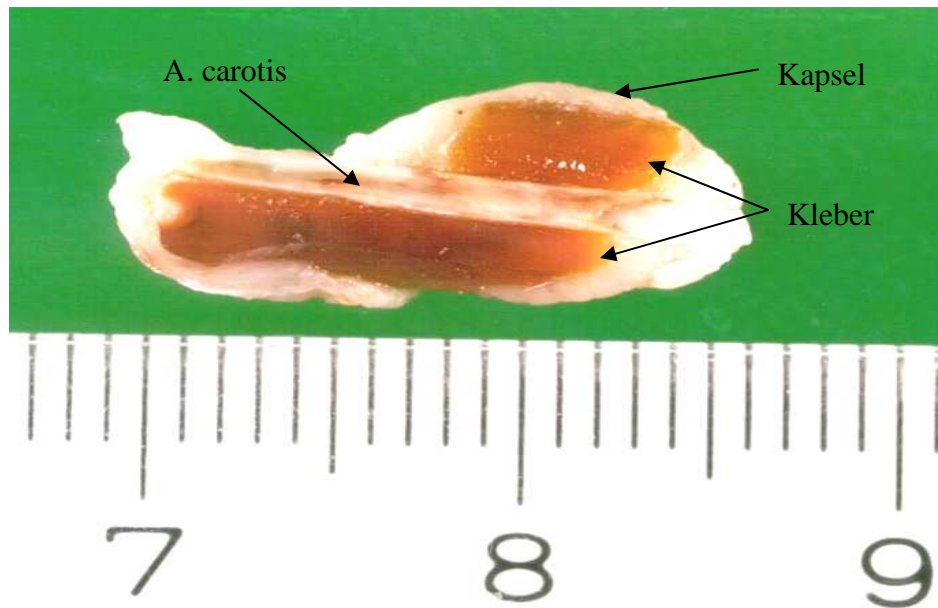


Abb.19: Kapselbildung in der Gruppe KN

3.2.2 Abszessbildung

Zuzüglich des Abszesses, der bei der Angiographie entdeckt wurde, konnten in der K- Gruppe zwei weitere Abszessausbildungen bei der Explantation der Arteria carotis festgestellt werden (3/13; 23,1%). Beim Zerteilen der prallen, elastisch imponierenden Kapsel der Klebeanastomosen kam es hierbei zum Entleeren von 3-4 ml geruchlosem, gelb-weißlichem, zähem Pus, der zwischen der bindegewebigen Kapsel und dem Kleber lokalisiert war. Die Gefäßanastomosen waren in 2 von 3 Fällen auffindbar und nicht zersetzt, jedoch verschlossen.

Eine Abszessbildung konnte in den Gruppen KN und N nicht registriert werden.

Gruppe	K (n=13)	KN (n=9)	N (n=9)
Abszessbildung	3 (23,1%)	0	0

Tab.9: Häufigkeit von Abszessbildung in den Gruppen K, KN und N

3.2.3 Aneurysmen

Bei 4/12 (33,3%) Tieren der Gruppe K kam es zu aneurysmatischen Veränderungen im Bereich der Klebeanastomose, wovon *ein* Aneurysma durchgängig war (Abb.20).

Die restlichen drei okkludierten Gefäße mit Aneurysmen wiesen im Bereich der Aussackung und im Gefäßlumen thrombotisches, teils organisiertes Material auf.

Bei makroskopischer Betrachtung gewinnt man den Eindruck, als ob die derbe bindegewebige Kapsel, die sich um den Kleber gebildet hat, als Begrenzung bzw. Außenwand für mögliche Einblutungen fungiert (Abb.21).

Es läßt sich jedoch nicht klären, ob es sich bei der Einblutung um eine Veränderung im Sinne eines Aneurysma spuriums oder dissecans handelt. Möglicherweise ist es durch eine Anastomoseninsuffizienz bedingt, oder durch Kleberabräumungsprozesse entstanden (Pseudoaneurysma).

In den Gruppen KN und N wurde bei keinem der Tiere eine aneurysmatische Veränderung beobachtet.

Gruppe	K (n=12)	KN (n=9)	N (n=9)
Aneurysmabildung	4 (33,3%)	0	0

Tab.10: Häufigkeit der Ausbildung aneurysmatischer Veränderungen in den Gruppen K, KN und N

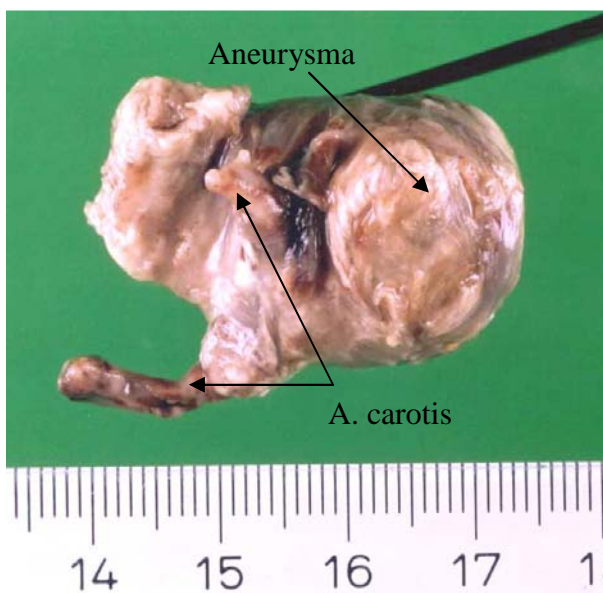


Abb.20: Aneurysma, Gruppe K



Abb.21: Aneurysmaquerschnitt, Gruppe K

3.2.4 Kleberbeschaffenheit

Sowohl in der Gruppe K, als auch in der KN- Gruppe vermittelt der Kleber bei allen Präparaten ein anderes Bild als direkt nach Applikation. Beim Zerteilen der Proben fiel auf, dass der Kleber brüchig und porös wirkte und sich vereinzelte Stücke vom ansonsten homogen wirkenden Kleberstamm abgelöst hatten (Abb.22, 23). Bei 4/12 (33,3%) Proben der Gruppe K war die Arteria carotis aus der Klebeanastomose komplett losgelöst und fand sich als verschlossener Gefäßstumpf mit anhängendem Kleberrest im umliegenden Gewebe (Abb.24). Der Kleber war am proximalen bzw. distalen Übergang zum Gefäß brüchig geworden.

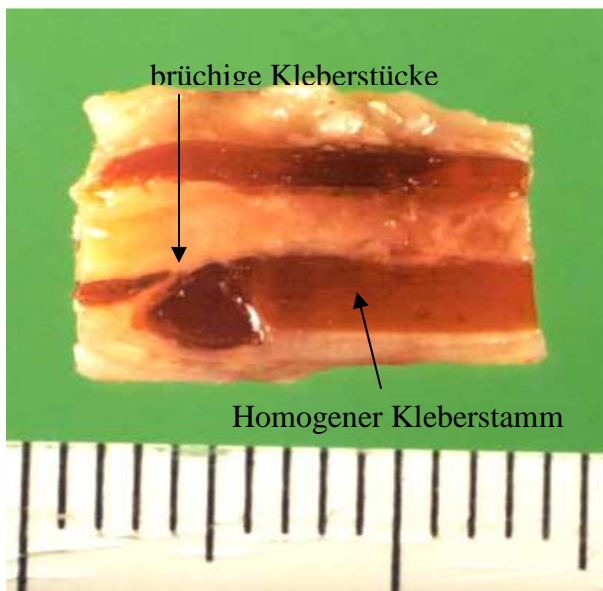


Abb.22: Brüchiger Kleber, Gruppe K

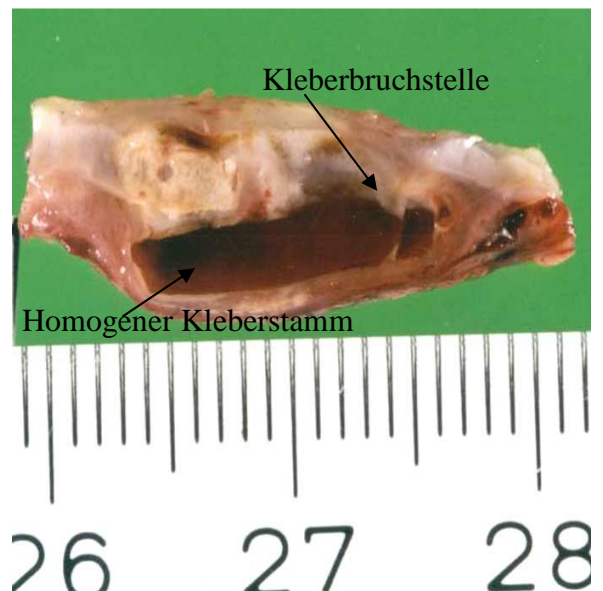


Abb.23: Kleberbruchstelle, Gruppe KN



Abb.24: „Herausgebrochene“ Gefäßenden, Gruppe K

3.2.5 Verkalkungen

Bei 12/12 (100%) Tieren der Gruppe K und bei 9/9 (100%) Tieren der Gruppe KN konnten milchige, weißlich imponierende, teilweise konfluierende Kalkspritzer im Bereich der Gefäßwand beobachtet werden. Diese in beiden Gruppen gleichartig ausgeprägten Verkalkungen erstrecken sich über die komplette Länge des applizierten Klebers (Abb.26, 27). Nach dem proximalen und distalen Kleberende erscheint wieder eine glatte, glänzende und kalkfreie Gefäßwand. Bei *einem* Tier der Gruppe K konnte ebenfalls eine Verkalkung im Bereich des Kleber-Kapsel Übergangs beschrieben werden (Abb.25).

Bei der Gruppe N konnten bei keinem der Tiere Verkalkungen der Gefäßwand festgestellt werden.

Gruppe	K (n=12)	KN (n=9)	N (n=9)
Verkalkungen	12 (100%)	9 (100%)	0

Tab.11: Häufigkeit von Verkalkungen der Gefäßwand in den Gruppen K, KN und N

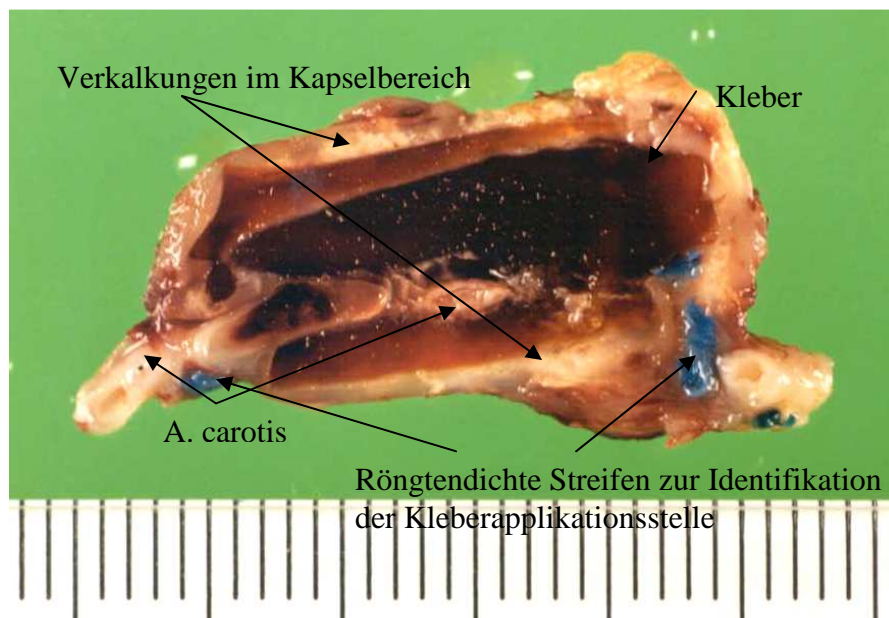


Abb.25: Verkalkungen im Kapselbereich, Gruppe K

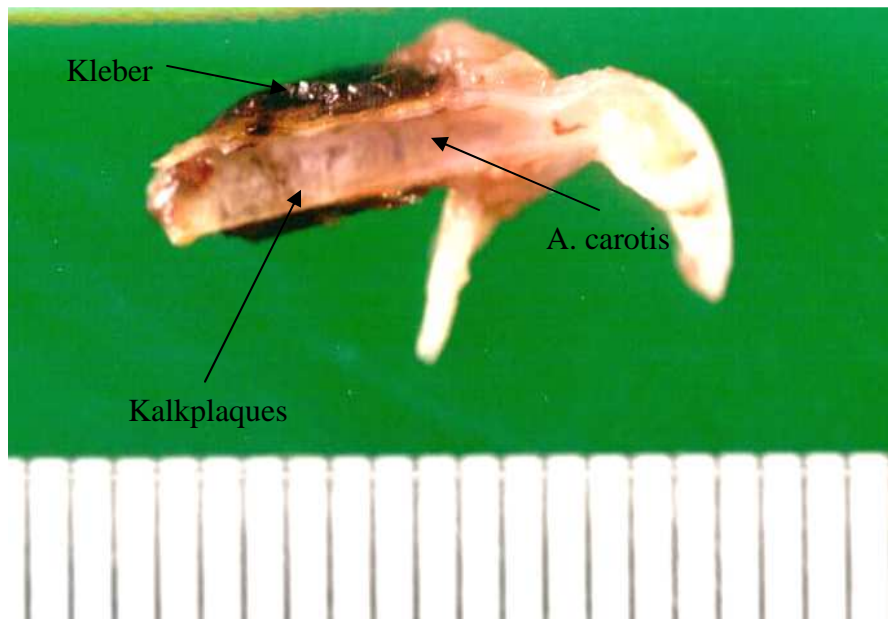


Abb.26: Verkalkungen in der Gefäßwand, Gruppe KN

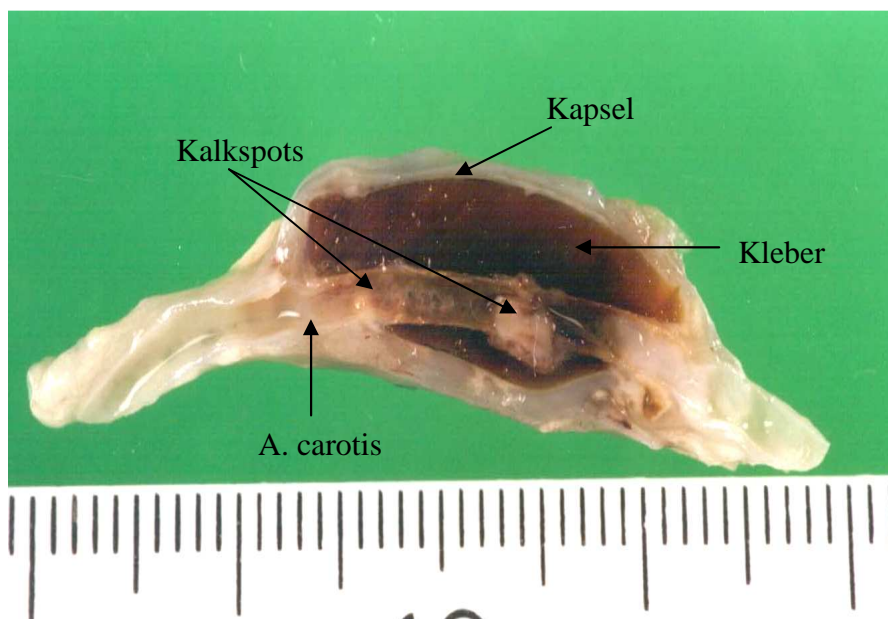


Abb.27: Verkalkungen in Bereich der Gefäßwand, Gruppe K

3.2.6 Stenosen

Vergleicht man die angiographisch ermittelten Stenosen mit den dazugehörigen makroskopischen Bildern der 3 Proben der Gruppe K und der 9 Proben der Gruppe KN, die einen Stenosegrad 2, 3 bzw. 4 aufwiesen, so zeigt sich, dass die Stenosen an den Applikationsorten des Klebers auftreten. Es kann jedoch nicht geklärt werden, ob die Stenose als eine Reaktion auf den Kleber mit möglichen Wandverdickungen oder Kalkeinlagerungen entsteht oder ob sie rein technisch entsteht. Es könnte hierbei die Fixierung des Gefäßes in leicht spastischem Zustand verantwortlich sein. Bei den 10 Proben der Gruppe K mit einem Gefäßverschluss (Grad 5) zeigte sich, dass 4/10 Tiere einen Gefäßstumpf aufwiesen, der aus dem Kleber losgelöst war. Weitere 3/10 Tiere wiesen ein Aneurysma mit thrombosiertem Gefäß auf und 2/10 Tiere exprimierten einen vollständigen bzw. subkapsulären Abszess innerhalb der Klebeanastomose. Bei 1/10 Tieren war eine mögliche Ursache der Stenose nicht nachvollziehbar.

Ursache der Stenose	Gruppe K (n=13)	Gruppe KN (n=9)
Kleber	3 (23,1%)	9 (100%)
Gefäßabriss mit Kleberbruch	4 (30,8%)	0
Aneurysma	3 (23,1%)	0
Abszess	2 (15,4%)	0
Nicht nachvollziehbar	1 (7,7%)	0

Tab.12: Häufigkeit der Ursachen von Stenosen in den Gruppen K und KN

3.3 Histopathologische Untersuchung

3.3.1 Kapsel

Alle Tiere der Gruppe K (12/12) und KN (9/9) bildeten im postoperativen Verlauf eine Kapsel um den Kleber aus. Die Kapsel liegt bei allen Proben der äußeren Kleberschicht direkt an und umfaßt den Kleber zirkulär in seinem kompletten Umfang. Die Abb.31 (H.E.- Färbung) lässt in der Kapselwand massenhaft Fibroblasten und Fibrozyten erkennen, was für eine gesteigerte Kollagensynthese

spricht. Auf Grund der sehr hohen intrakapsulären Kollagenfaserdichte und der Art der Bündelung der kollagenen Fasern erhält die Kapsel einen narbenartigen Charakter. An Stellen an denen Kleber abgebaut wurde, ist eine reaktive Fibroblastenaktivierung festzustellen. Der entstandene Defekt wird durch Bindegewebe aufgefüllt, was besonders in den Abb. 30 und 32 (H.E.- Färbung) deutlich wird. Hier wurde der Kleber in der Mitte, oberhalb der anastomosierten Gefäßenden, komplett abgebaut und durch Bindegewebe ersetzt. Zwei isolierte Kleberinseln, proximal und distal der Anastomose, bilden den Rest des einst homogenen Klebers.

Bei der Gruppe N (9/9) konnte auch histologisch keine Kapselbildung beobachtet werden.

Gruppe	K (n=12)	KN (n=9)	N (n=9)
Kapselbildung	12/12 (100%)	9/9 (100%)	0

Tab.13: Häufigkeit der Kapselbildung bei H.E. gefärbten Präparaten der Gruppen K, KN und N

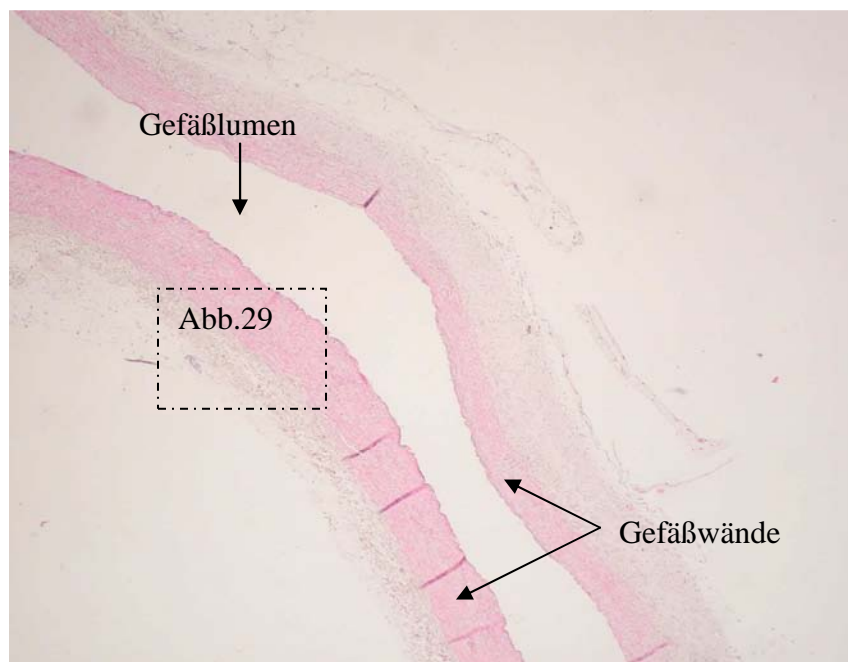


Abb.28: Native A. carotis, Längsschnitt, Vergrößerung x 100, H.E.-Färbung

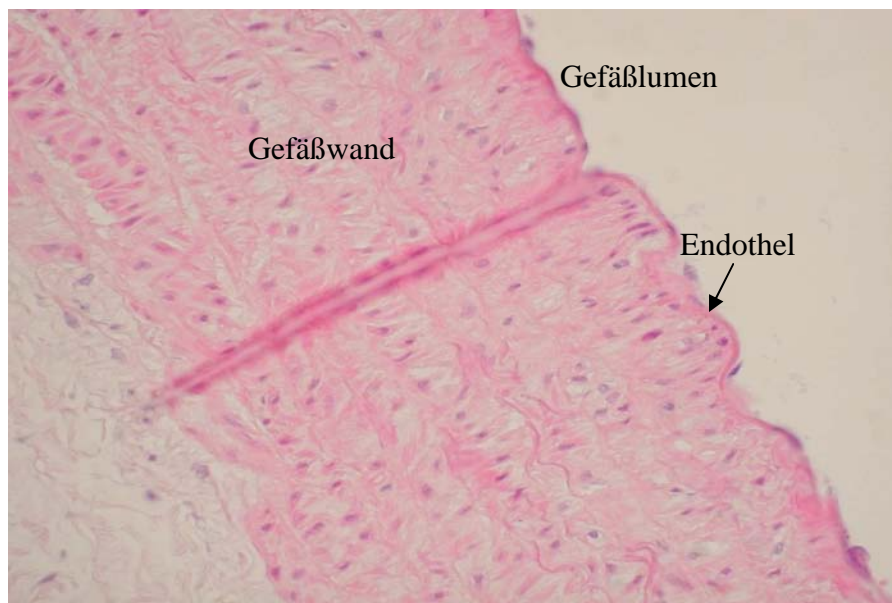


Abb.29: Native A. carotis, Vergrößerung x 400, H.E.-Färbung, Gruppe N

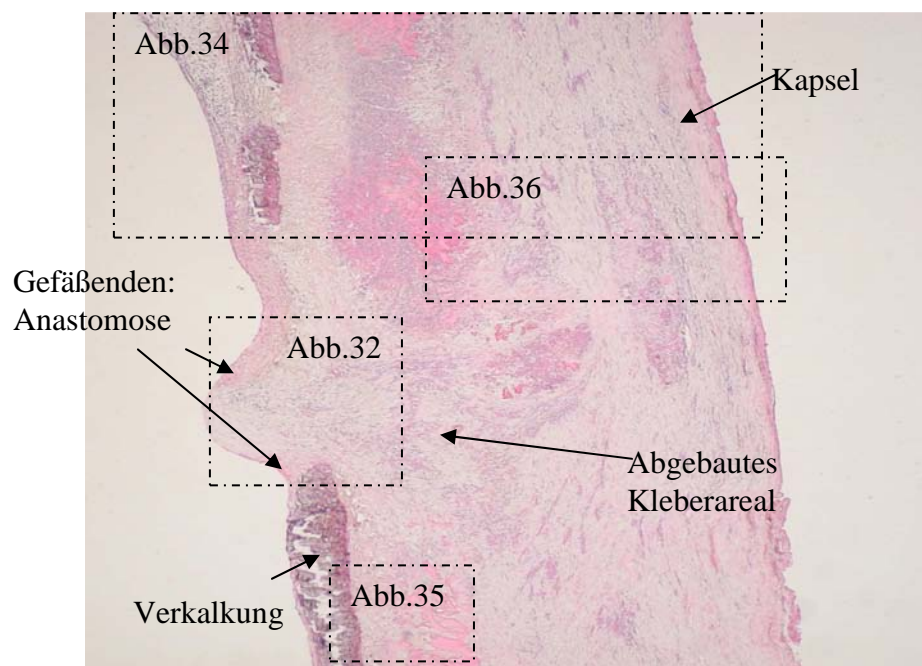


Abb.30: Übersichtstopographie Klebeanastomose: Kleberabbau, bindegewebiger Ersatz des Klebers, Verkalkungen und Kapselbildung, H.E.-Färbung, Vergrößerung $\times 40$, Gruppe: K

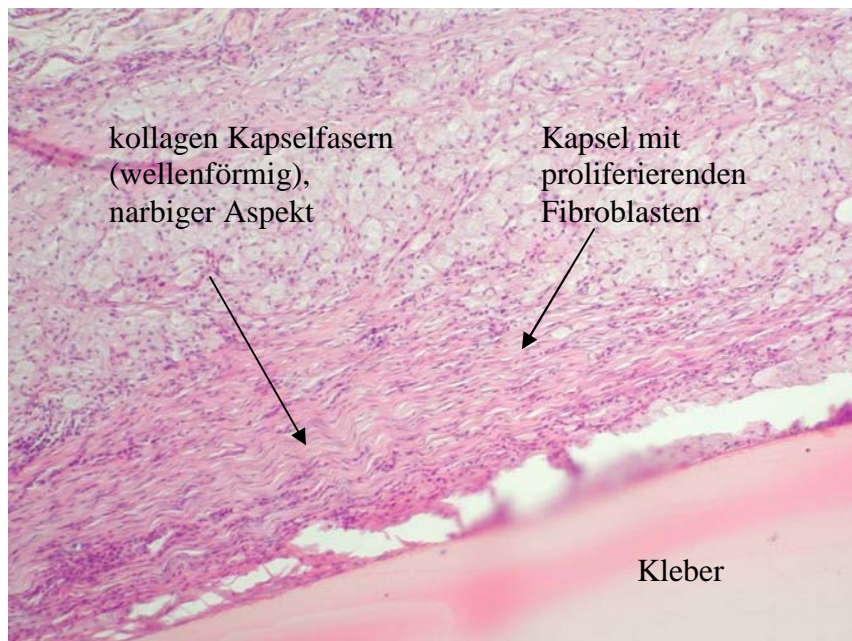


Abb.31: Kapsel mit proliferierenden Fibroblasten und narbenartigem Aspekt, Vergrößerung $\times 400$, H.E.-Färbung, Gruppe K

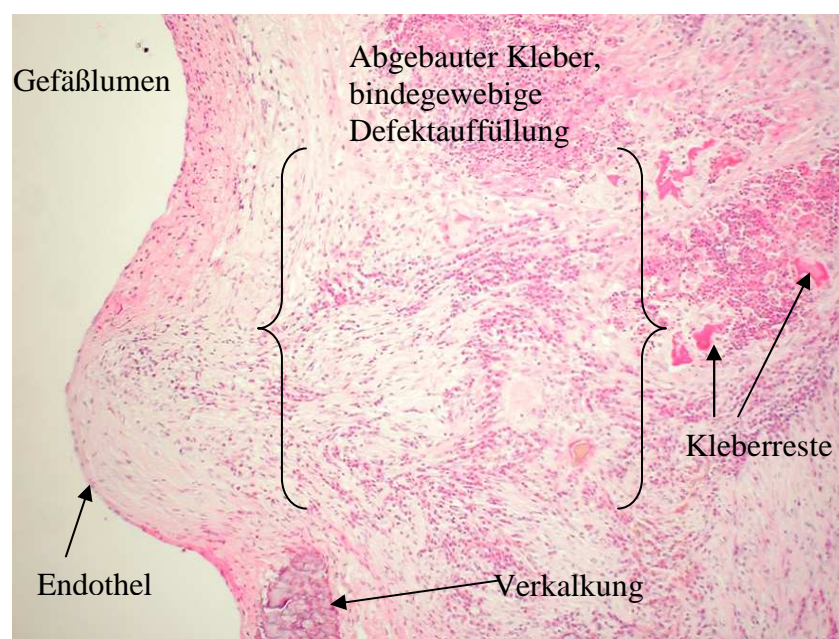


Abb.32: Kleberabbau im direkten Anastomosengebiet mit bindegewebiger Defektfüllung, Vergrößerung $\times 400$, H.E.-Färbung, Gruppe K

3.3.2 Kleber

Der eosinophil erscheinende Kleber wird sowohl bei 12/12 (100%) Tieren der Gruppe K, als auch bei 9/9 (100%) Tieren der Gruppe KN abgebaut.

Hierbei wird der Kleber in der Gruppe K bei 9/12 (75%) Tieren von allen möglichen Angriffspunkten her, d.h. von Kapselseite, vom Übergang Kleber – Adventitia und von den Seitenflächen, zersetzt (siehe Abb.33). Bei den restlichen 3/12 Tieren (25%) vollzieht sich der Kleberabbau nur im Übergangsbereich der Kapsel zum Kleber.

Bei der Gruppe KN wird der Kleber bei 9/9 (100%) Tieren von der Kapselseite, im Übergangsbereich Kleber – Adventitia und von den Seitenflächen her abgebaut.

Mikroskopisch wird sichtbar, dass der Kleber nicht mehr als homogene Masse erhalten ist und stückweise von phagozytären Zellen, wie Makrophagen, Granulozyten und Histozyten, zersetzt wird (Abb.30, 34, 37). Es finden sich zirkulär um den Kleber kleine abgespaltene Kleberstücke, die von Entzündungszellen umringt sind. Entzündungszellen fressen sich kleine Lakunen oder Spalten, von denen aus sie sternförmig in die Tiefe des Klebers vordringen (Abb.35-39).

Entstandene Defekte am Kleber werden durch Bindegewebe ersetzt. Bei zwei Tieren konnte beobachtet werden, dass der Kleber von der Mitte aus in zwei große Teile zersetzt worden war und durch fibroblastäres Bindegewebe ersetzt wurde (Abb.34).

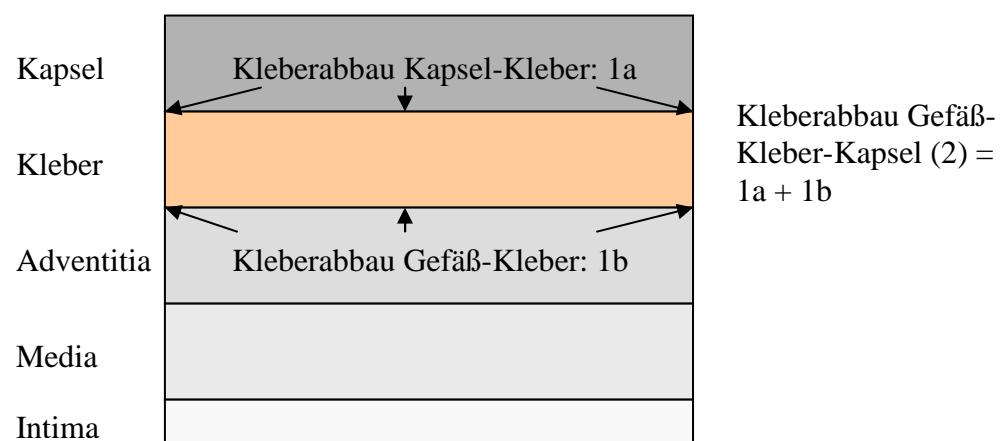


Abb.33: Schematische Darstellung der Lokalisation des Kleberabbaus

Lokalisation des Kleberabbaus	Gruppe K (n=12)	Gruppe KN (n=9)	Insgesamt K+KN (n=21)
0= homogen erhalten	0	0	0
1a= Kapsel-Kleber	3 (25%)	0	3 (14,3%)
1b= Gefäß-Kleber	0	0	0
2= Gefäß-Kleber-Kapsel	9 (75%)	9 (100%)	18 (85,7%)

Tab.14: Häufigkeit der Lokalisation des Kleberabbaus in den Gruppen K, KN bzw. K + KN, siehe Abb. 33 zur Verdeutlichung der Lokalisation des Kleberabbaus

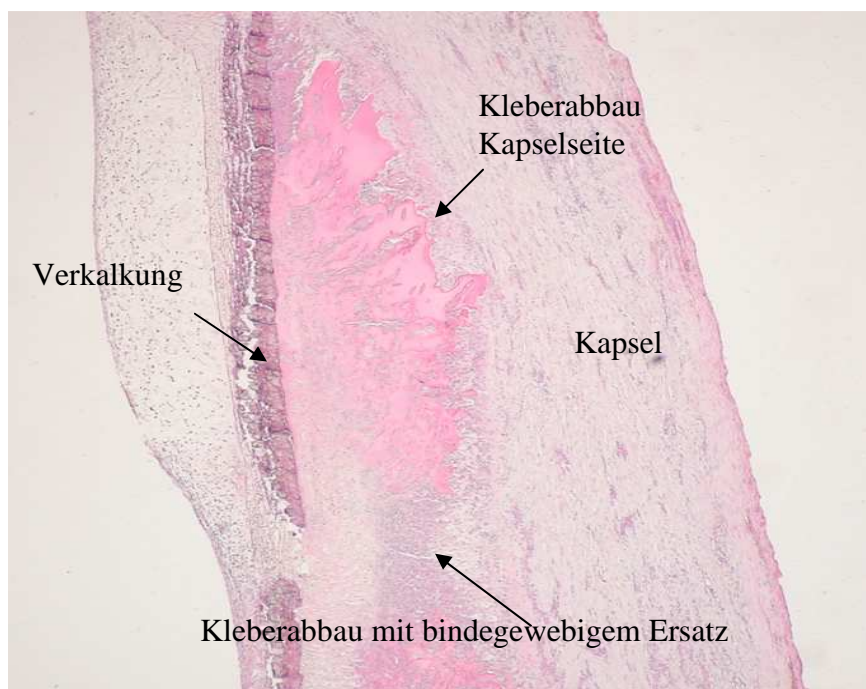


Abb.34: Übersichtstopographie, Vergrößerung x 100, H.E.-Färbung
Gruppe K

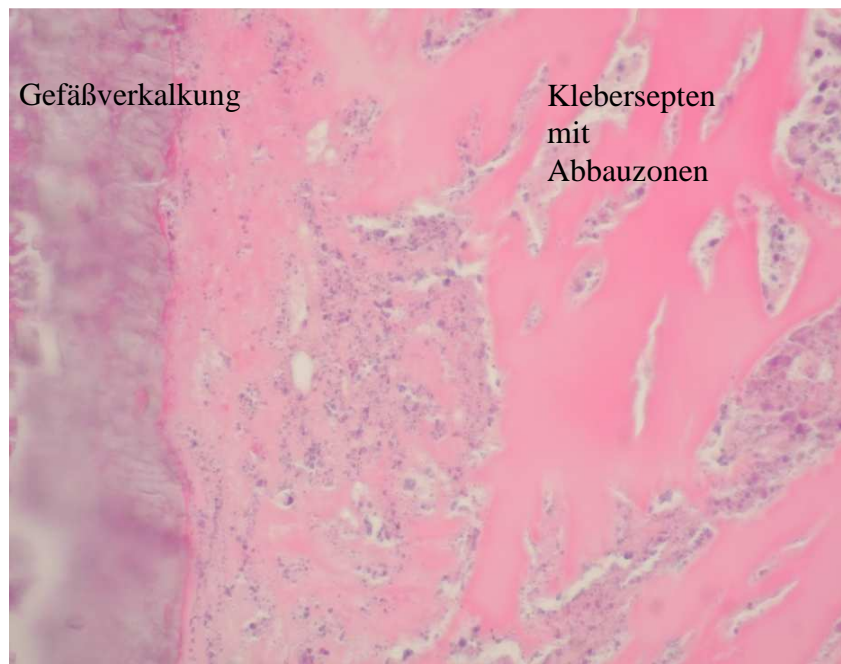


Abb.35: Kleberabbau von Gefäßseite, Vergrößerung x 400,
H.E.-Färbung, Gruppe K

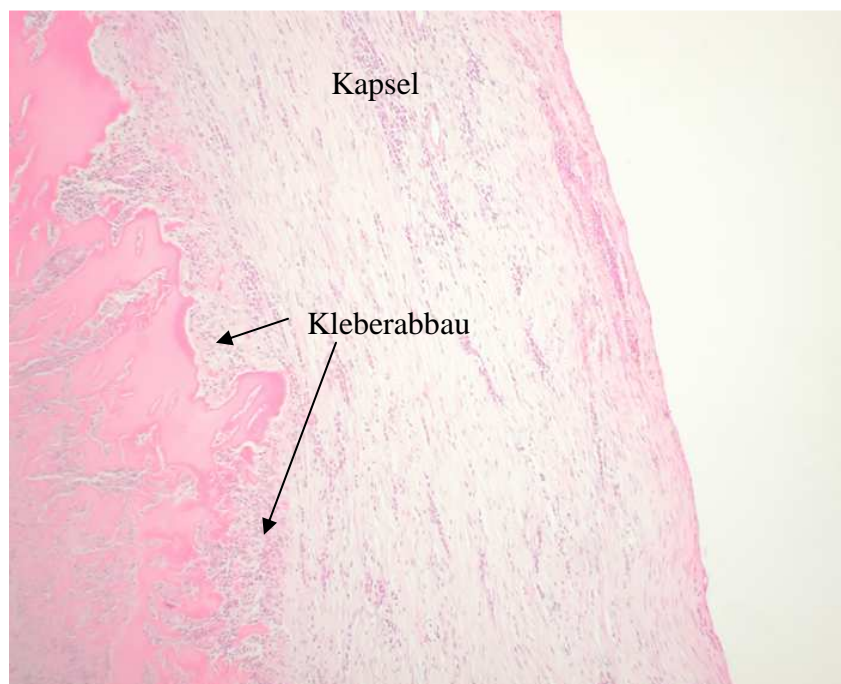


Abb.36: Kleberabbau von Kapselseite, Vergrößerung x 100,
H.E.-Färbung, Gruppe K

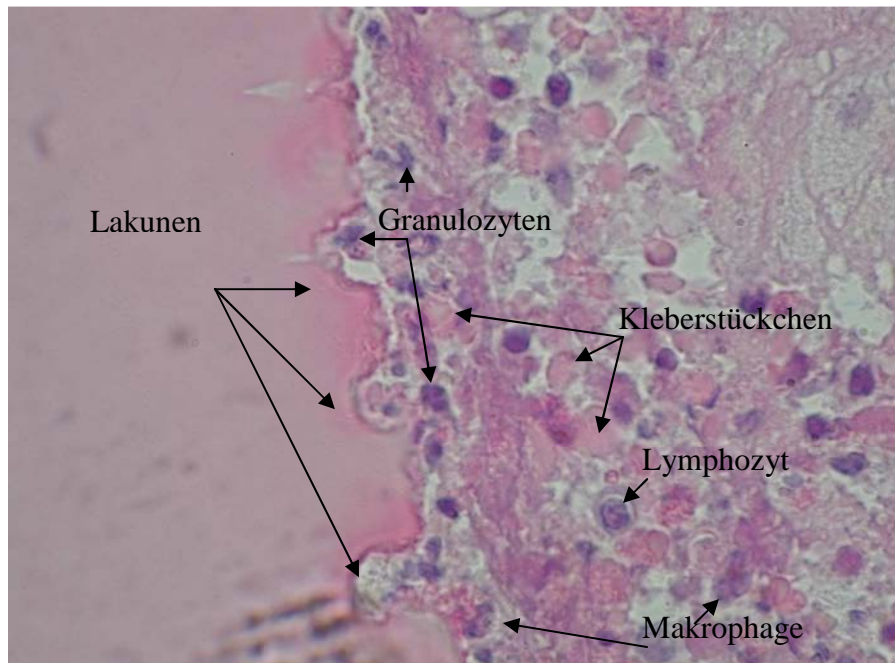


Abb.37: Kleberabbau mit Lakunenbildung im Kapselbereich, Entzündungszellen
Vergrößerung x 1000, H.E.-Färbung, Gruppe K

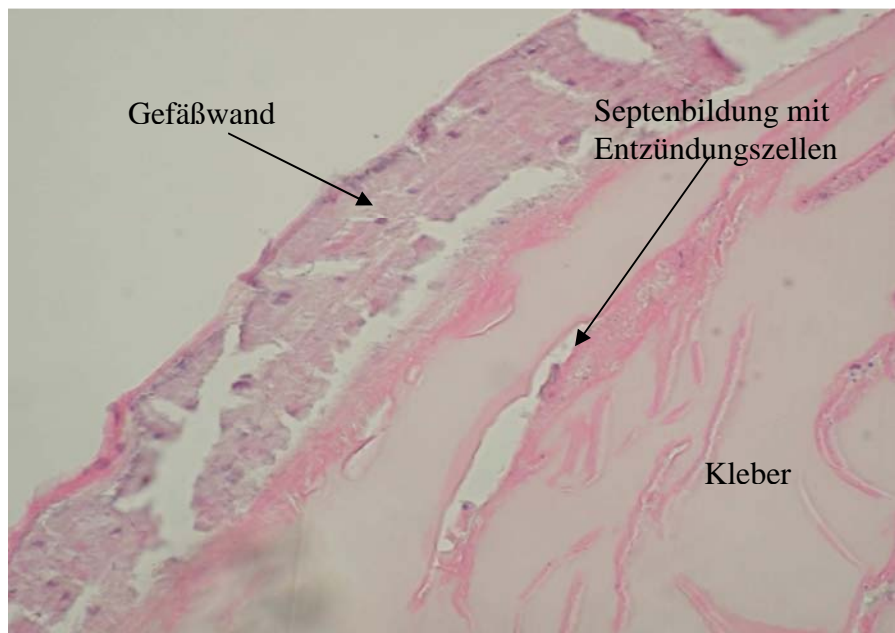


Abb.38: Kleberabbau ausgehend von Gefäßseite, Vergrößerung x 400,
H.E.-Färbung, Gruppe K

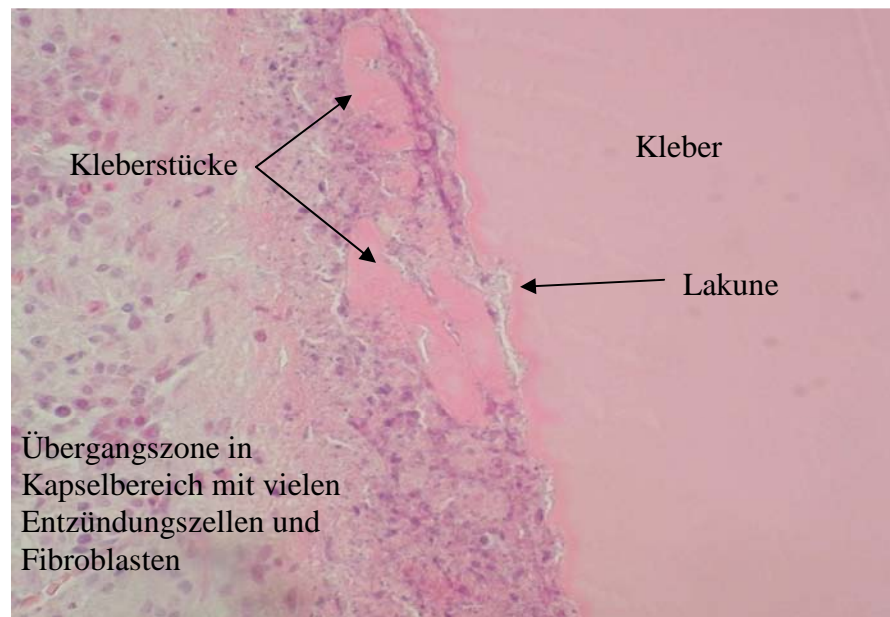


Abb.39: Kleberabbau im Kapsel-Kleber-Übergang, Vergrößerung x 400, H.E.-Färbung, Gruppe K

3.3.3 Entzündungszellen

In den H.E.- und immunhistologisch angefärbten Präparaten zeigte sich bei 11/12 (91,7%) Tieren der Gruppe K und 9/9 (100%) Tieren der Gruppe KN ein sehr homogenes und wiederkehrendes Bild einer massiven Entzündungsreaktion. Diese Entzündungsreaktion weist einen granulomatösen Charakter auf, da sie sich aus einer Infiltration von vielen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Histiozyten und Riesenzellen bzw. Granulomzellen zusammensetzt.

Bei 1/12 (8,3%) Tieren der Gruppe K bestand nur eine mäßig ausgeprägte granulomatöse Entzündungsreaktion.

Bemerkenswert ist, dass sich bei allen Tieren eine zirkuläre, auf den Kleber limitierte Schichtung von verschiedenen Entzündungszellen und Entzündungszellstadien gebildet hat (Abb.40). Direkt am Kleber befindet sich die Abbauzone, die vorrangig durch eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Histiozyten

besteht (Abb.42). Sie fressen kleine Lakunen oder Spalten in die homogene Kleberoberfläche und phagozytieren kleine Kleberstücke. In den Abbildungen 40 und 41 wird direkt nach dieser Abbauzone eine Zellschicht sichtbar, die sich durch extrem angeschwollene Zelleiber charakterisiert. Gut sichtbar wird hier die Entwicklung der Makrophage zur Schaumzelle (balloniert). Nach dieser ballonierten Entzündungszellschicht präsentiert sich ein Gebiet mit Makrophagen, welche sich zu Riesen / Granulomzellen zusammengeschlossen haben (Abb.42). Weiter fällt in der direkten Umgebung dieser Riesen / Granulomzellen eine diffuse rote Tüpfelung des Bindegewebes auf (Abb.42, 43). Verstreut im Bindegewebe sind immer wieder vereinzelte Kleberstückchen zu finden.

Nach dieser Schicht folgen neu ins Gewebe eingewanderte Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Ebenfalls eingewandert sind auch vereinzelte Fibroblasten, die zugleich zwischen Granulom und Schaumzellen sichtbar sind (Abb.40,41).

Betrachtet man diese Zellzonen hintereinander, dann gibt die Reihenfolge der Zellschichtung den chronologischen Kleberabbau wieder. Zuerst beginnen Makrophagen, Granulozyten und Histiozyten kleine Lakunen und Septen in den Kleber zu fressen. Hierbei schwellen ihre Zelleiber an, bis vermutlich ihre Phagozytosekapazität erschöpft ist. Sie treten ab und schließen sich entweder zu Riesen / Granulomzellen zusammen oder bzw. und gehen zugrunde. Der Zelluntergang wird durch die Entleerung der roten intrazytoplasmatischen Granula (H.E.-Färbung) ins Gewebe sichtbar, was sich an einigen Stellen als diffuse rote Tüpfelung anfärbt (Abb. 42,43).

In der Gruppe N, die bei keinem Tier eine pathologische Entzündungsreaktion aufwies, waren bei allen Präparaten vereinzelte Makrophagen und Histiozyten zu sehen, die aber eher als physiologisch einzustufen sind (Abb.44). Es wurden nie Riesenzellen oder Schaumzellen beobachtet.

granulomatöse Entzündungszellen	Gruppe K (n=12)	Gruppe KN (n=9)	Gruppe N (n=9)
viel	11 (91,7%)	9 (100%)	0
mäßig	1 (8,3%)	0	0
wenig	0	0	9 (100%)

Tab.15: Häufigkeit von granulomatösen Entzündungszellen bei H.E. gefärbten Präparaten der Gruppe K, KN und N

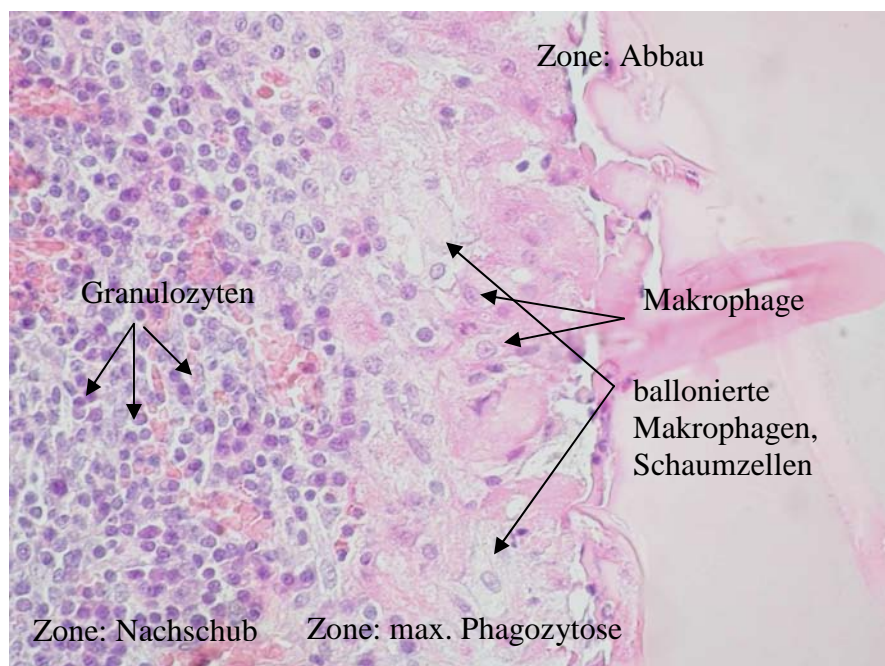


Abb.40: Wiederkehrende Schichtung der Kleberabbauzonen, Stadien der Makrophage zur Schaumzelle, Vergrößerung x 400, H.E.-Färbung, Gruppe K

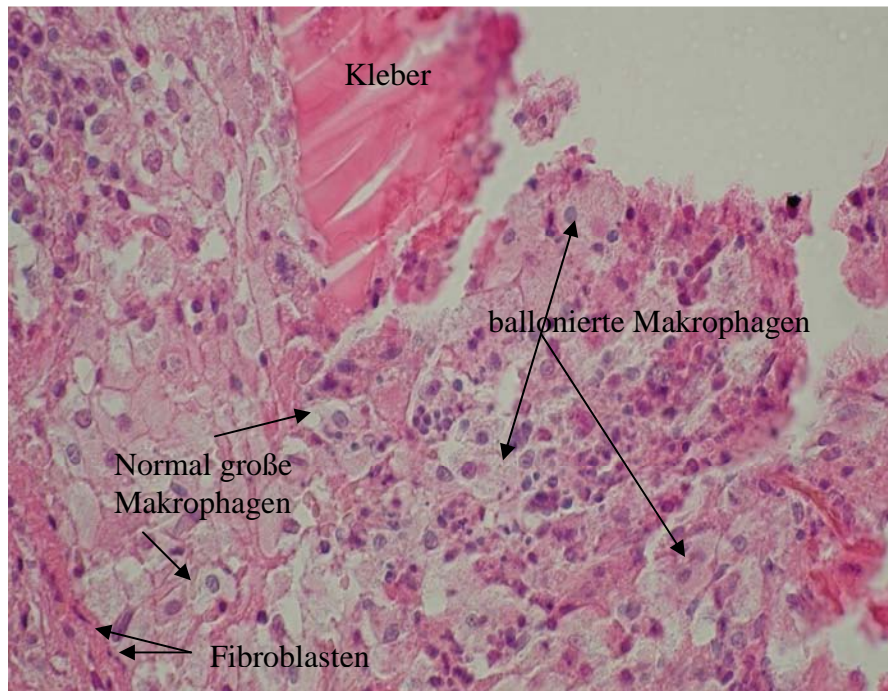


Abb.41: Ballonierte Makrophagen mit beginnender Riesenzellbildung, Fibroblasten, Vergrößerung x 1000, H.E.-Färbung, Gruppe K

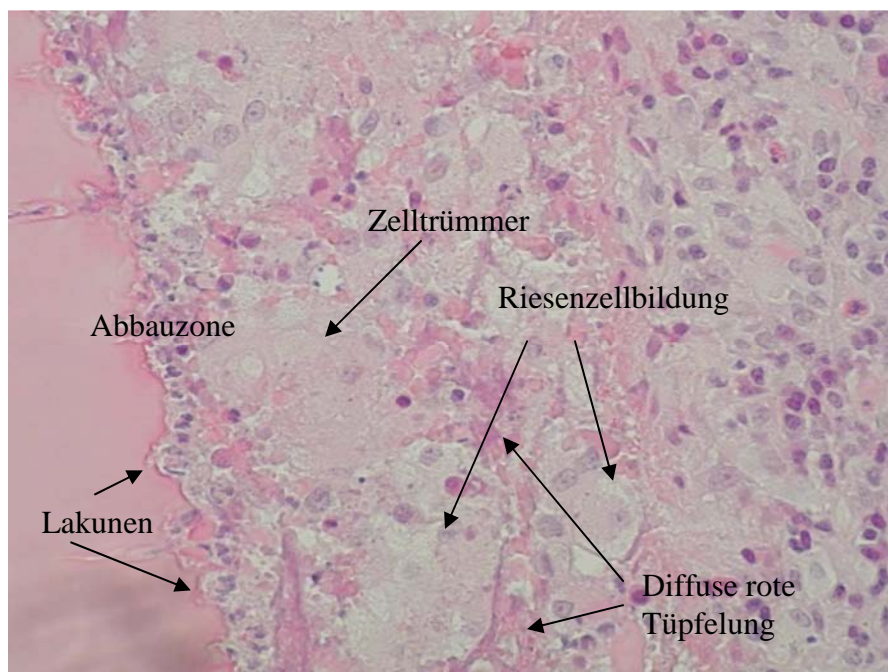


Abb.42: Riesenzellbildung und Untergang von Makrophagen, Vergrößerung x 400, H.E.-Färbung, Gruppe K

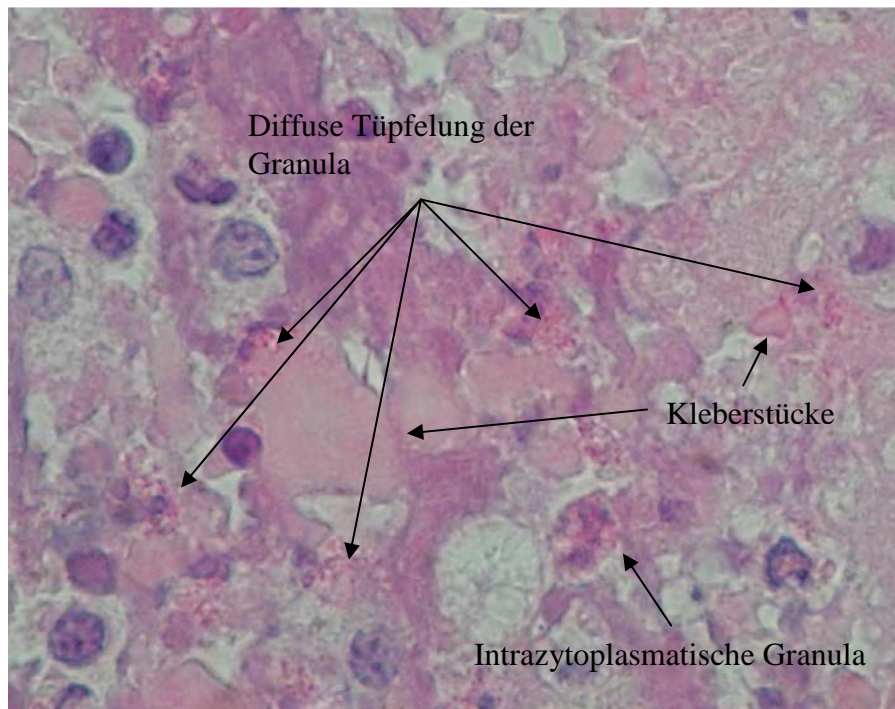


Abb.43: Eosinophile Granula im Gewebe, Vergrößerung x 1000,
H.E.-Färbung, Gruppe K



Abb.44: Natives Gefäß mit örtlicher Makrophage (Histiocyt), Vergrößerung x 400,
H.E.-Färbung, Gruppe N

3.3.3.1 Immunhistochemie

Histologisch bietet die immunhistochemische Färbung MAC 387 durch ihre intensive rote Anfärbung von Makrophagen, Histozyten und Granulozyten einen spezifischen Nachweis dieser Entzündungszellen. Die anhand der H.E.- gefärbten Zellmorphologie beschriebenen und charakterisierten Entzündungszellen konnten somit eindeutig differenziert bzw. bestätigt werden.

In den Abbildungen 45 und 46 wird deutlich, dass Makrophagen, Histozyten und Granulozyten eingewandert sind und in die zuvor homogene Kleberoberfläche Lakunen und kleine Septen fressen. Sie dringen durch den stetigen Abbau des Klebers immer tiefer, so dass kleine Kleberstücke von der homogenen Klebermasse abgespalten werden und somit im umliegenden Bindegewebe des Klebers zu finden sind (Abb.47). In allen Abbildungen ist besonders gut die rot angefärbte intrazytoplasmatische Granula der Makrophagen, Histozyten und Granulozyten zu sehen. Beim Untergang dieser Zellen wird diese Granula ins Bindegewebe ausgeschüttet, was später eine diffuse rote Tüpfelung des Bindegewebes hervorruft (Abb.45-47). Neben dieser roten Tüpfelung sind die Zelltrümmer der untergegangenen Zellen sichtbar. Eine Differenzierung der Riesen- bzw. Granulomzellen ist mittels dieser Färbemethode nicht möglich. Die Ergebnisse aus 3.3.3 konnten damit bestätigt werden.

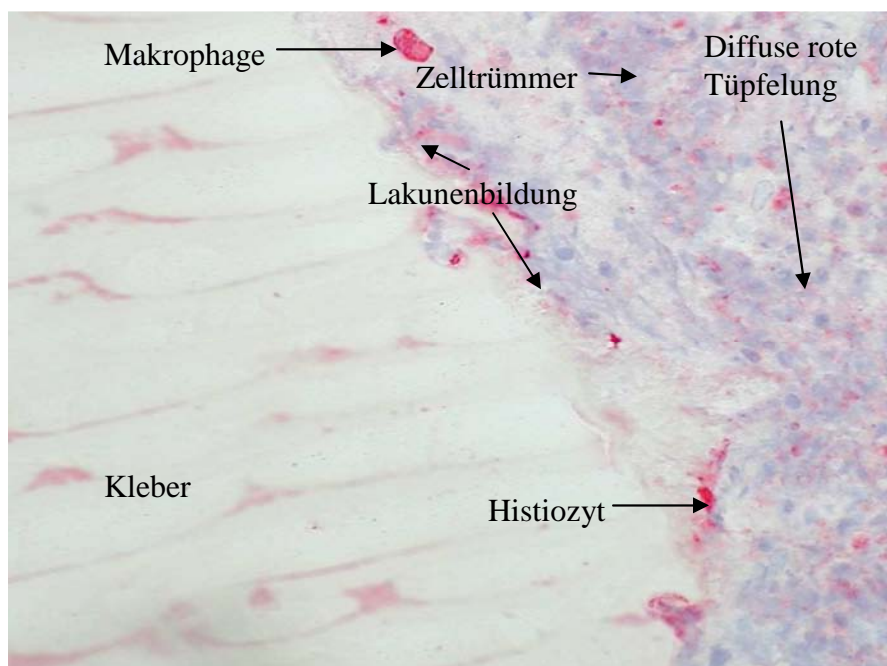


Abb. 45: Rot angefärbte Makrophagen, Histozyten in Lakunen, Vergrößerung x 100, MAC 387-Färbung, Gruppe K

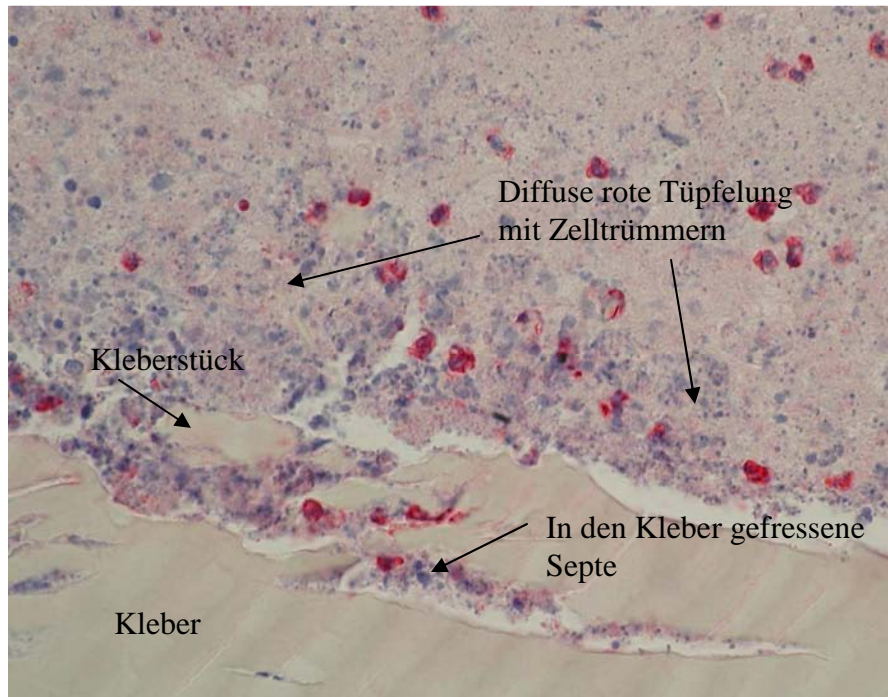


Abb.46: Rot angefärbte Makrophagen, Histiocyten in Septen, Kleberabbau, Vergrößerung x 400, MAC 387-Färbung, Gruppe K

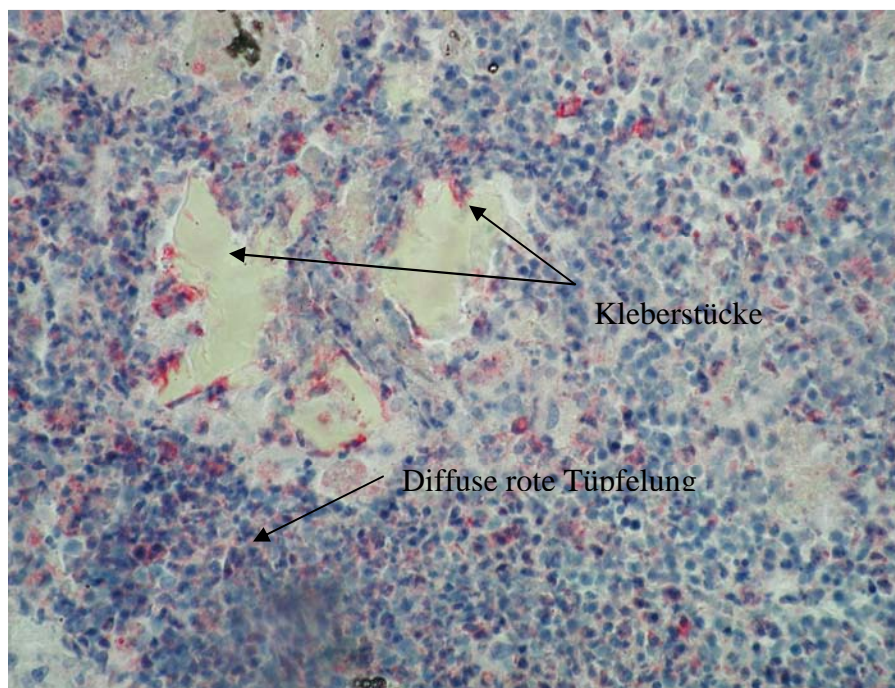


Abb.47: Angefärbte Granula mit Makrophagen, Histiocyten, Abgespaltene Kleberstücke, Vergrößerung x 400, MAC 387-Färbung, Gruppe K

3.3.4 Verkalkungen

In allen Präparaten der Gruppen K und KN waren Verkalkungen sichtbar, die jedoch in ihrer Lokalisation in den verschiedenen Schichten des Gefäßes variierten (siehe Tab.16 und Abb.48).

Die eosinophil bis lila, schuppig erscheinenden Verkalkungen bildeten sich in der Gruppe K bei 7/12 (58,3%) Tieren zwischen der Adventitia und Media aus (Abb.49). 4/12 (33,3%) Tiere zeigten eine Verkalkung zwischen Media und Intima (Abb.50). Bei 1/12 (8,3%) Tieren konnte eine Verkalkung der kompletten Intima festgestellt werden. Hierbei lag das Endothel der Verkalkung direkt auf. In der Gruppe KN bestand eine einheitliche Lokalisation der Verkalkung. Bei 9/9 (100%) Tieren bildete sich diese zwischen der Adventitia und Teilen der Media aus. Bei allen Tieren der Gruppe K und KN konnten zusätzlich Verkalkungen, auch Verkalkungsvorstufen mit schollenartigem Aussehen im Übergang von der Kapsel zum Kleber beobachtet werden (Abb.52). Anhand der Abbildungen 51 und 52 wird deutlich, dass Entzündungszellen, Fibroblasten und kollagene Fasern Calciumphosphate (siehe Versilberung nach Kossa, 3.3.4.1) einlagern, untergehen und Kalkschüppchen ausbilden. Zum Teil sind stark pyknotische, verkalkte Zellkerne mit einem aufgetriebenen Zytoplasma sichtbar. Bei der Gruppe N konnten Verkalkungen im Bereich der Kapsel und Gefäßwand nicht beobachtet werden.

Kalkvorkommen	Gruppe K (n=12)	Gruppe KN (n=9)	Gruppe N (n=9)
0= kein Kalk	0	0	9 (100%)
1= Adventitia & Media	7 (58,3%)	9 (100%)	0
2= Media & Intima	4 (33,3%)	0	0
3= Intima	1 (8,3%)	0	0
4= Kapsel	12 (100%)	9 (100%)	0

Tab.16: Häufigkeit der Lokalisation von Kalkvorkommen in den Gruppen K, KN und N (siehe Abb.48)

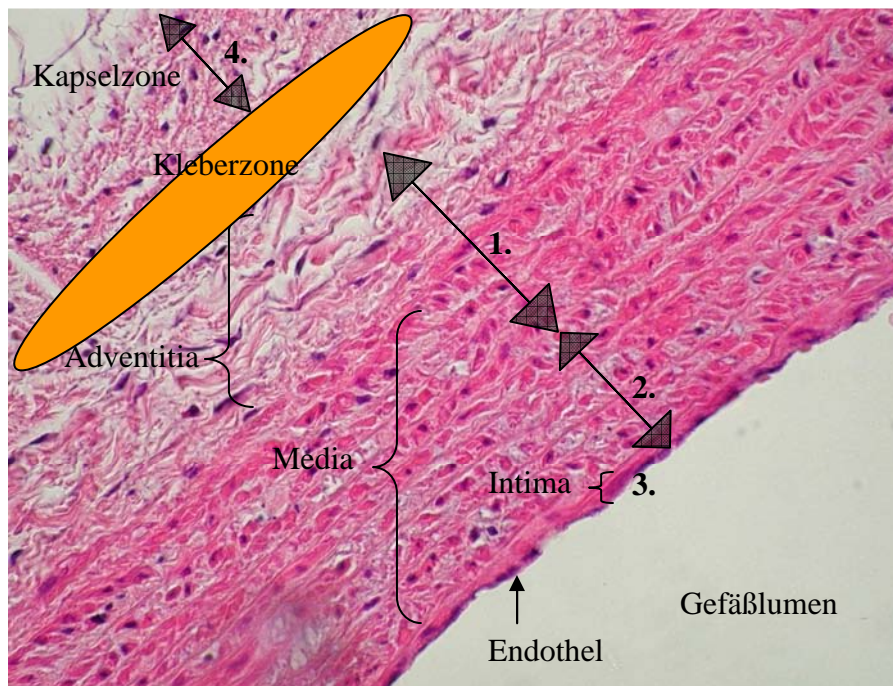


Abb.48: Natives Gefäß ohne Verkalkungen zur Darstellung der möglichen Verkalkungslokalisationen, Vergrößerung x 400, H.E.-Färbung, Gruppe N

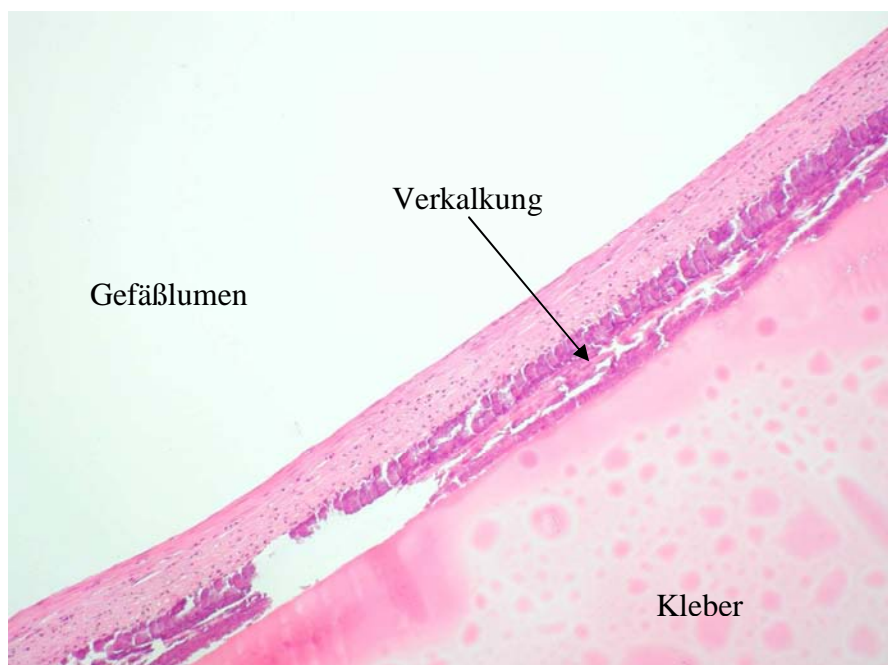


Abb.49: Verkalkung zwischen Adventitia und Media, Vergrößerung x 100, H.E.-Färbung, Gruppe K

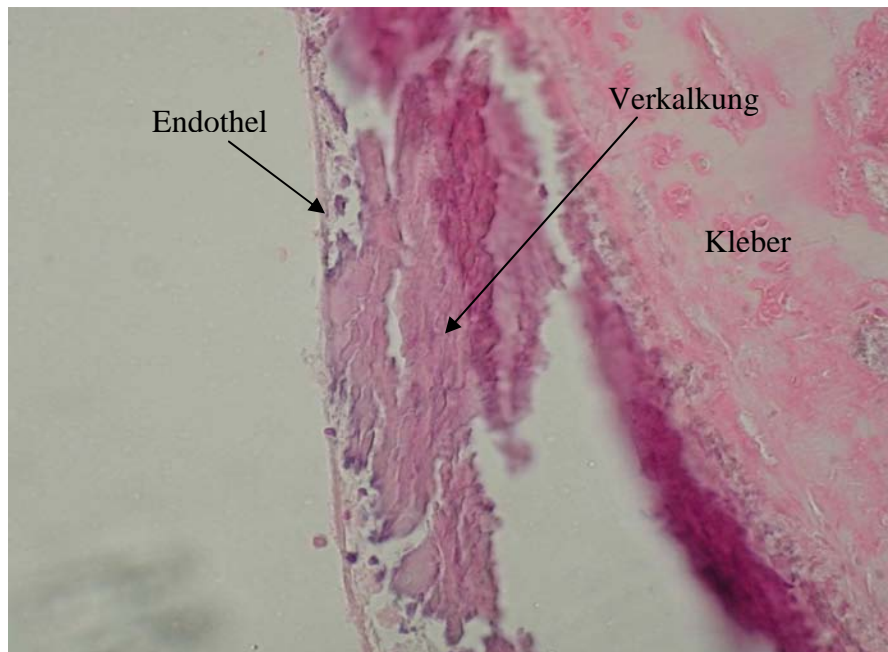


Abb.50: Verkalkung zwischen Media und Intima, Vergrößerung x 400, H.E.-Färbung, Gruppe K

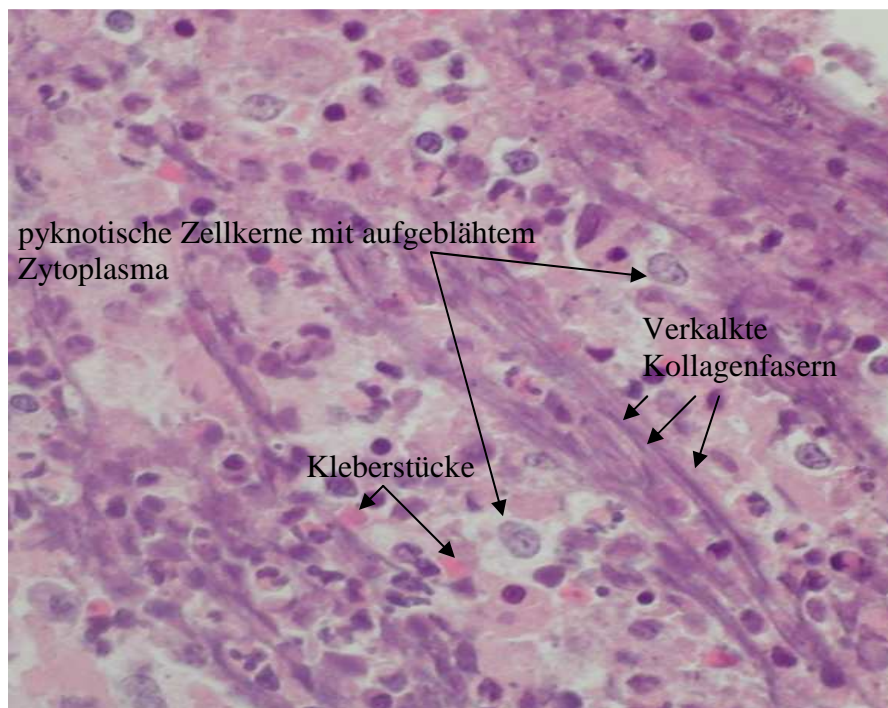


Abb.51: Verkalkungen entlang von Kollagenfasern und Zellen mit pyknotischem Zellkern und aufgeblähtem Zytoplasma, Vergrößerung x 1000, H.E.-Färbung, Gruppe K

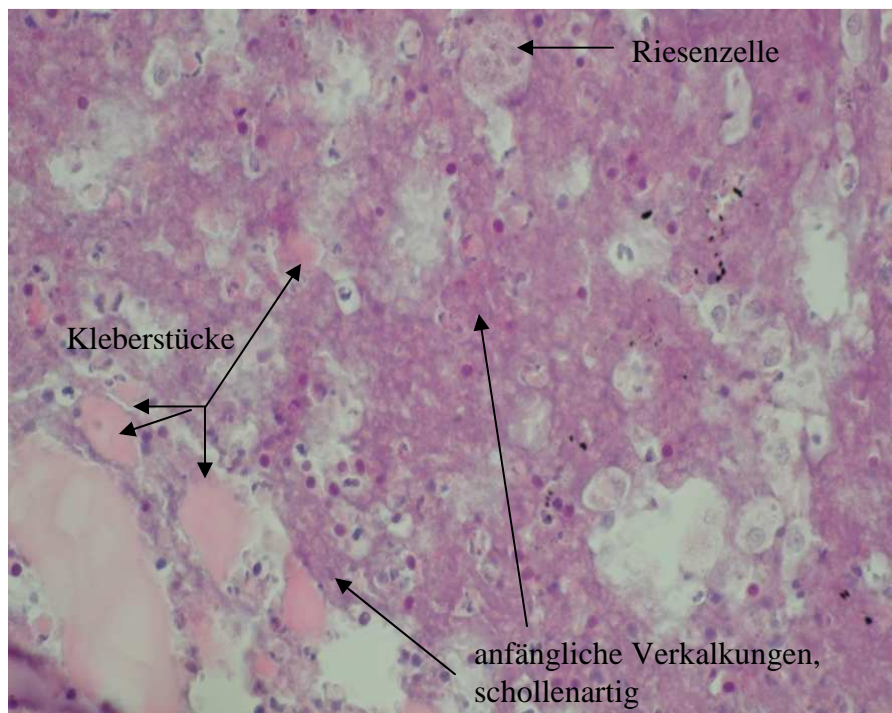


Abb.52: Diffuse Verkalkungsvorstufen im Bindegewebe (kapselnah),
Vergrößerung x 400, H.E.-Färbung, Gruppe K

3.3.4.1 Kalknachweis nach Kossa

Die Annahme, dass es sich bei den Verkalkungen in Bereich der Gefäßwand und der Kapsel um calciumphosphathaltige Plaques handelt, konnte mittels der Färbung nach Kossa (Krutsay, 1963) bei allen Kalkvorkommen bestätigt werden. Die schwarz erscheinenden Plaques sind mit der Lokalisation in der H.E.-Färbung deckungsgleich (Abb.53).

Es konnte aufgrund einer verbleibenden Silbernitratsschicht auf den Objektträgern, die als schwarz-flächiger Gries erscheint, keine Darstellung der Verkalkungen im Kapsel/Kleber-Übergang angefertigt werden.

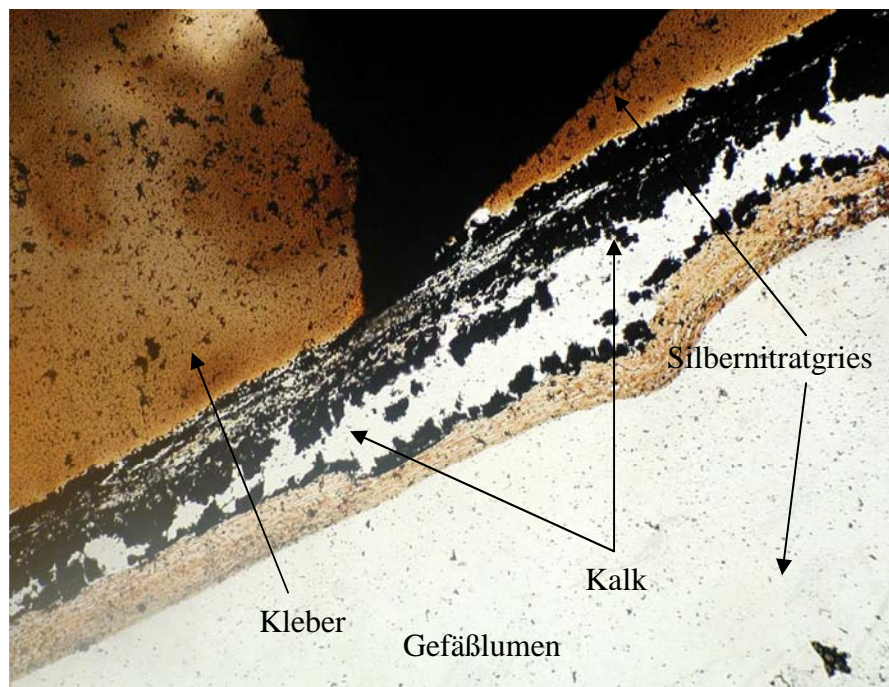


Abb.53: Schwarz imponierende Verkalkungen der Gefäßwand, Vergrößerung x 100, Versilberung nach Kossa, Gruppe K

3.3.5 Thromben

In der Gruppe K konnte bei 6/9 (66,7%) nicht durchgängigen Klebeanastomosen der Gruppe K eine intravasale Thrombenbildung dokumentiert werden. Bei 3 dieser 6 thrombosierten Anastomosen handelt es sich um die bereits makroskopisch beschriebenen Aneurysmen. Bei den restlichen 3/6 verschlossenen Anastomosen ist ein wandständiger Thrombus im Stadium der Organisation sichtbar (Abb.54).

Die übrigen 3/9 (33,3%) nicht durchgängigen Anastomosen zeigten mikroskopisch keinen Thrombus, obwohl sie angiographisch einen Stenosegrad 5 aufwiesen.

Vermutlich hat sich hier der gebildete Thrombus durch den Fixations- und Schneideprozess herausgelöst.

Bei einer Anastomose, die durchgängig war und einen Stenosegrad 4 aufwies, konnte eine Einblutung mit folgender intraluminärer Thrombenbildung dorsal der geklebten Anastomose festgestellt werden. Die zwei Gefäßenden sind durch den ins Gefäßlumen hineinragenden Thrombus disloziert (Abb.55,56,57). Auch dieser Thrombus weist das Stadium der Organisation auf.

Eine Thrombenbildung konnte in den Gruppen KN und N nicht beobachtet werden.

Thrombenbildung	Gruppe K (n=9)
Thrombus mit Aneurysma	3 (33.3%)
Thrombus intravasal	3 (33.3%)
Nicht nachvollziehbar	3 (33.3%)

Tab.17: Häufigkeit und Art der Thrombenbildung bei okkludierten Gefäßen der Gruppe K

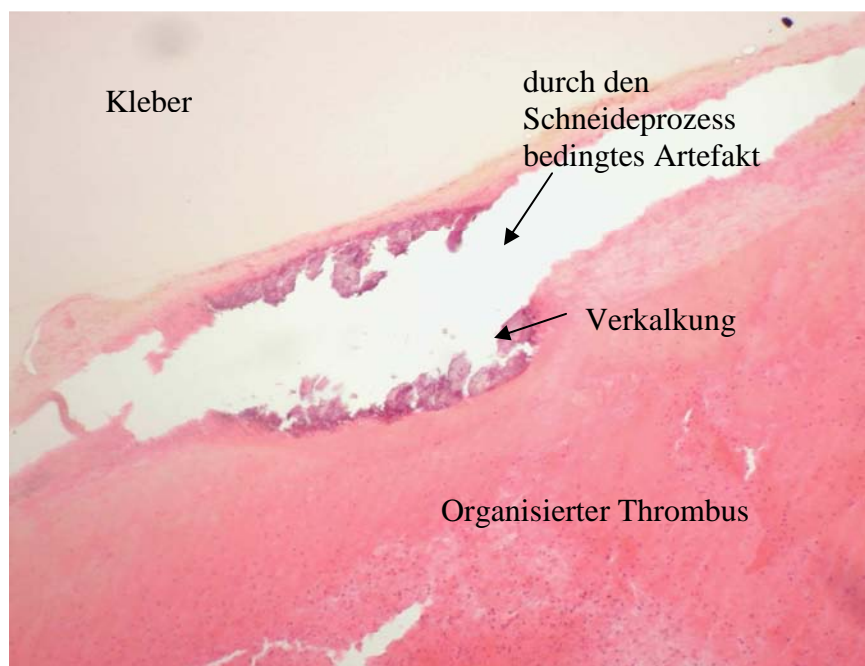


Abb.54: Organisierter Thrombus bei Stenosegrad 5, Vergrößerung x 100, H.E.-Färbung, Gruppe K

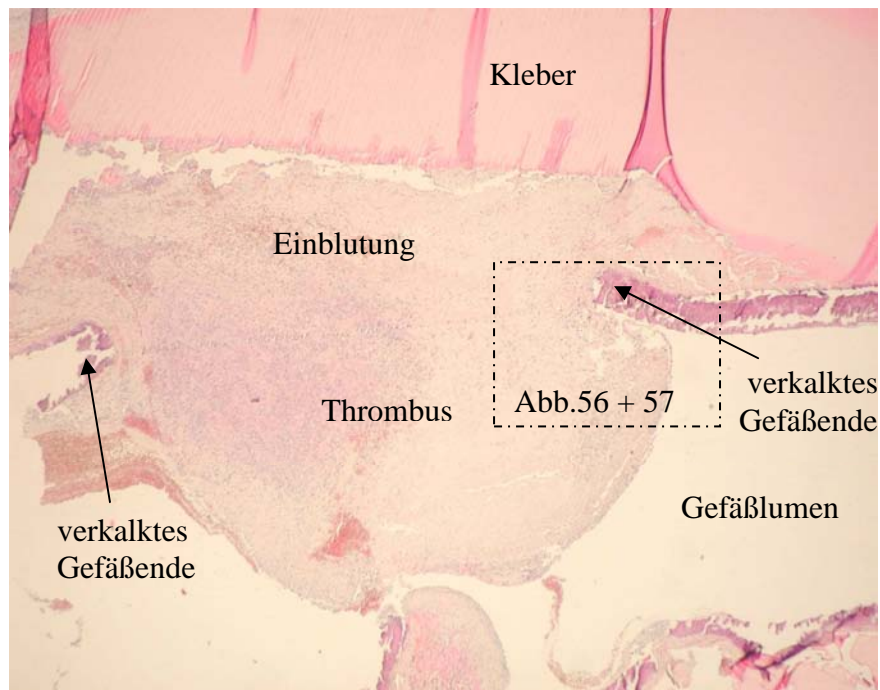


Abb.55: Organisierter Thrombus bei Stenosegrad 4, Vergrößerung x 40, H.E.-Färbung, Gruppe K

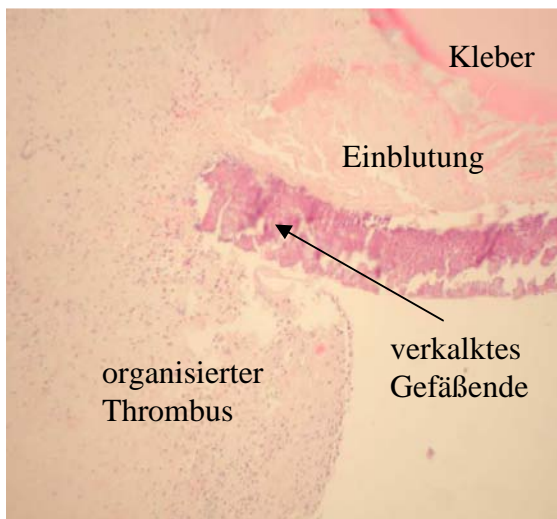


Abb.56: Organisierter Thrombus bei Stenosegrad 4, Vergrößerung x 100, H.E.-Färbung, Gruppe K

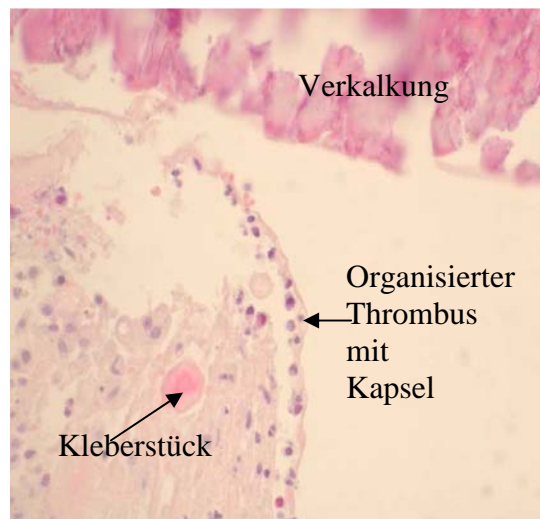


Abb.57: Organisierter Thrombus bei Stenosegrad 4, Vergrößerung x 400, H.E.-Färbung, Gruppe K

3.3.6 Endothel

Das Endothel war bei 9/9 (100%) Tieren der Gruppe K und bei 9/9 (100%) Tieren der Gruppe KN durchgehend erhalten und nicht pathologisch verändert (Abb. 58). Bei 3 der ursprünglich 12 Tiere der Gruppe K war das Endothel mikroskopisch sichtbar durch den Schneideprozess abgehobelt und zerteilt. Diese Proben konnten daher nicht beurteilt werden. In der Gruppe N war ebenfalls bei allen Tieren (9/9, 100%) das Endothel durchgehend erhalten und nicht verändert (Abb.55).

Endothelstatus	Gruppe K (n=12)	Gruppe KN (n=9)	Gruppe N (n=9)
durchgehend erhalten	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)
zerstört	0	0	0
gestückelt	0	0	0
nicht beurteilbar	3	0	0

Tab.18: Endothelstatus bei den Gruppen K, KN und N

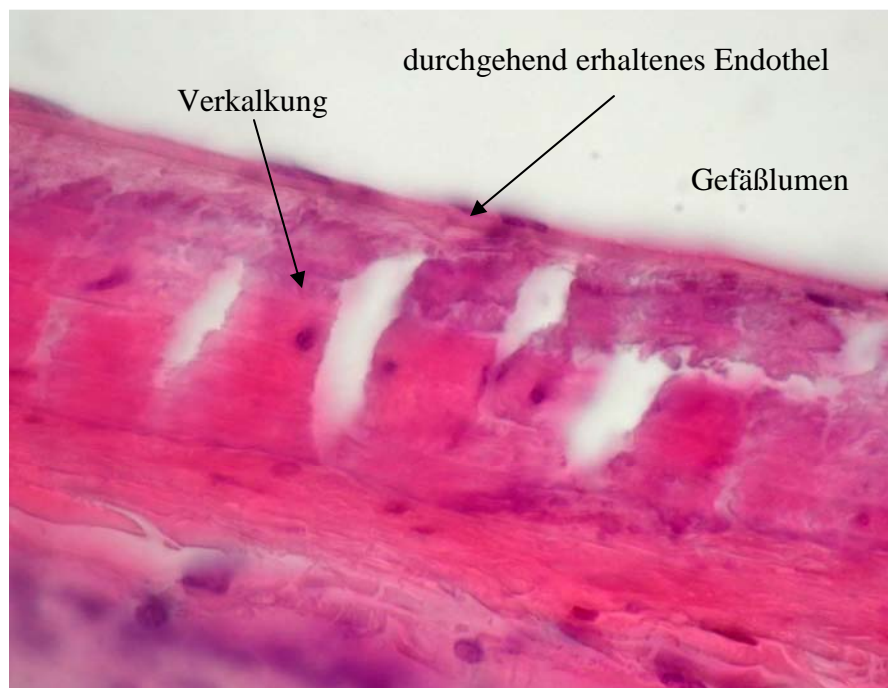


Abb.58: Durchgehend erhaltenes Endothel, Vergrößerung x 1000, H.E.-Färbung, Gruppe K

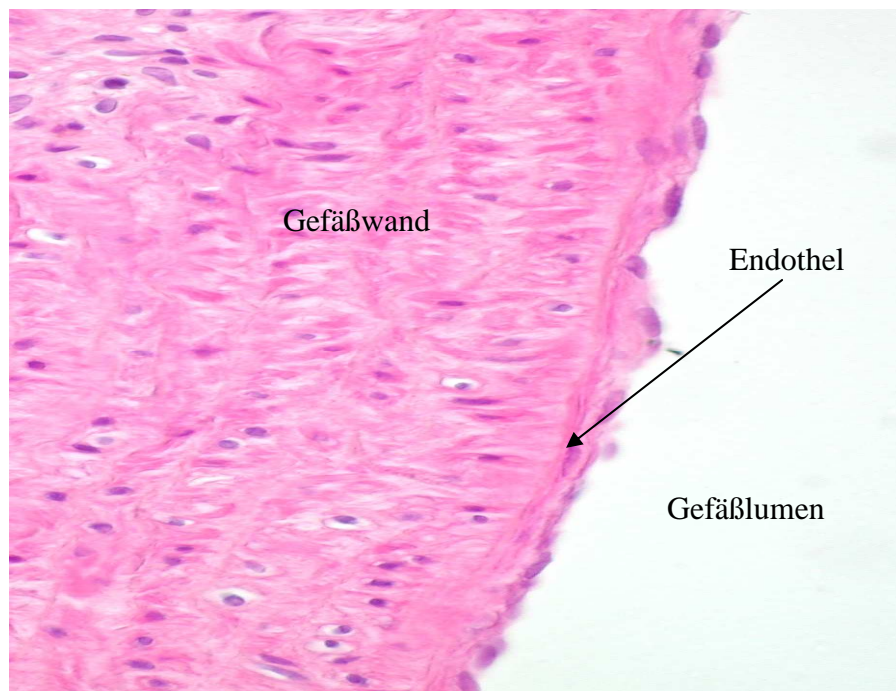


Abb.59: Durchgehend erhaltenes Endothel, Vergrößerung x 1000, H.E.-Färbung, Gruppe N

3.3.7 Kollagenneogenese

In der Elastica van Gieson- Färbung wurde sichtbar, dass in der Gruppe K bei 12/12 (100%) Tieren und in der Gruppe KN bei 9/9 (100%) Tieren eine Kollagenneogenese stattgefunden hat . 6/12 (50%) Tiere der Gruppe K bildeten neue Kollagenfasern sowohl im Kapselbereich, als auch in der Adventitia der Gefäßwand (Abb.60 und 61, histologisch rot angefärbte Fasern). Bei den anderen 6/12 (50%) Tieren der Gruppe K spielte sich die Kollagenneogenese nur im Bereich der Kapsel ab (Abb.61). In der Gruppe KN war bei allen (9/9, 100%) Proben eine kollagene Faserbildung im Bereich der Kapsel zu beobachten, während bei allen Tieren der N Gruppe eine Kollagenneogenese ausblieb.

Kollagenneogenese	Gruppe K (n=12)	Gruppe KN (n=9)	Gruppe N (n=9)
Kapsel	6 (50%)	9 (100%)	0
Gefäß	0	0	0
Kapsel & Gefäß	6 (50%)	0	0

Tab.19: Häufigkeit der Lokalisation der Kollagenneogenese in den Gruppen K, KN und N

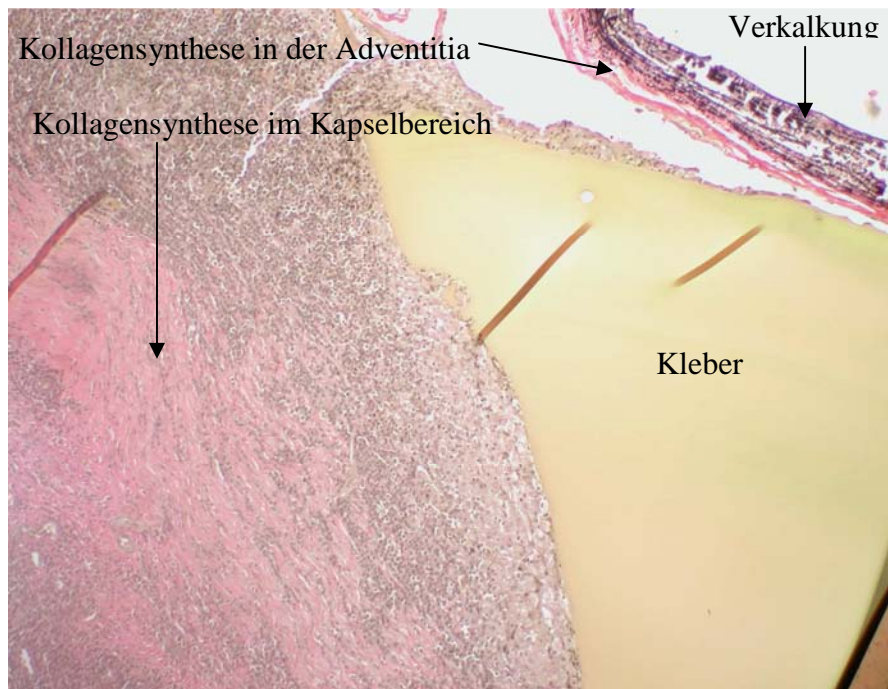


Abb.60: Kollagenneogenese im Bereich der Kapsel und Adventitia,
Vergrößerung x 100, EvG-Färbung, Gruppe K

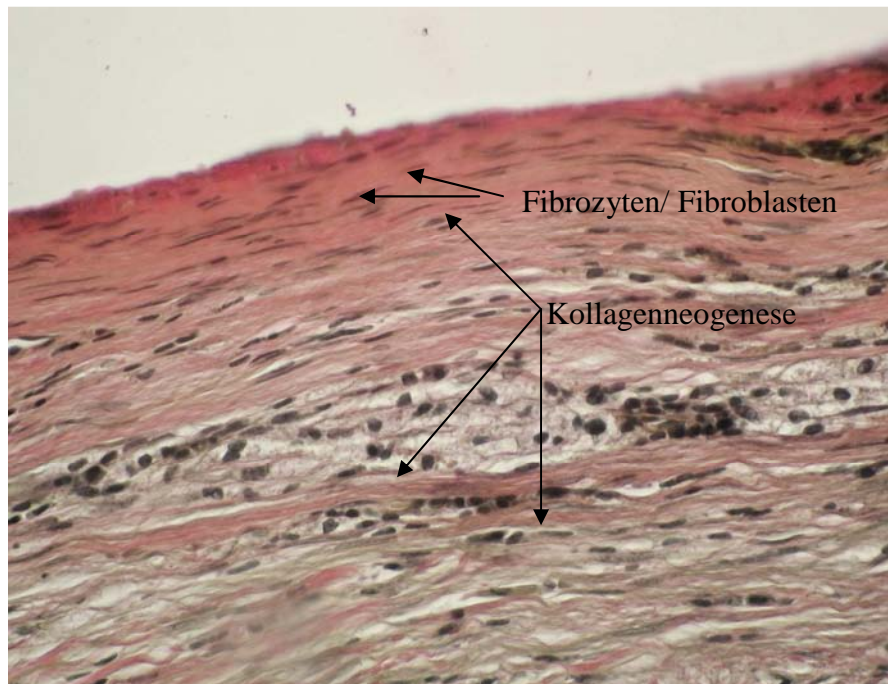


Abb.61: Kollagenneogenese im Bereich der Kapsel, Vergrößerung x 400,
EvG-Färbung, Gruppe K

4. Diskussion

Nachdem Schneider im Jahr 2004 an toten Schweineherzen gezeigt hatte, dass es unter Verwendung einer Ballonkathetertechnik möglich war, End-zu-Seit-Anastomosen mittels Bioglue zu kleben, konnten in der vorliegenden Studie sowohl die Technik, als auch die akute Haltbarkeit bzw. Offensein von End-zu-End-Klebeanastomosen an Kaninchencarotiden demonstriert werden.

Der Einsatz des Ballonkatheters in Verbindung mit zwei fixen Haltenähten ermöglichte eine optimale Schienung bzw. Fixierung und Offenhaltung der zu anastomosierenden Gefäßenden, so dass eine schnelle und einfache Applikation des Klebers möglich war. Weiter verhinderte der Ballonkatheter ein Eindringen des Klebers in das Gefäßlumen. Alle Gefäße waren nach der Anastomosierung durchgängig und pulsatil. Komplikationen, wie Nachblutungen im Anastomosenbereich, wurden nicht beobachtet. Die einfache Handhabung und leichte Reproduzierbarkeit dieses Anastomosierungsmodells machen aus rein technischer Sicht einen Einsatz in der konventionellen und auch in der minimal-invasiven Bypasschirurgie denkbar.

Trotz der guten funktionellen und frühpostoperativen Qualität der Klebeanastomosen zeigt sich im Langzeitversuch dazu ein unterschiedliches Bild, genauso wie zu den in- vivo- Langzeitergebnissen von Gundry (2000).

Gundry konnte in der makro/ mikroskopischen Aufarbeitung der zwei End-zu-Seit-Anastomosen nach zehn bzw. zwölf Monaten weder eine Stenosenbildung, noch eine Distorsion oder Aneurysmabildung feststellen. Weiter wurde eine Entzündungsreaktion im Anastomosengebiet nicht beobachtet. Gundry beschrieb jedoch, dass bei einem Tier der Kleber nicht vollständig absorbiert wurde und eine Kapselbildung um den Kleber zu Adhäsionen zwischen Anastomose und Perikard führte.

Die Aspekte der Kleberabsorption und der Kapselbildung um den Anastomosenbereich zeigen trotz der Verwendung eines anderen Tiermodells ein wichtiges gemeinsames Merkmal zu den in dieser Studie erzielten Ergebnissen. Dies wird bei Betrachtung der makro- und mikroskopischen Ergebnisse der Gruppe „Klebeanastomose“ (K) und „Kleber auf nativ“ (KN) besonders deutlich.

Alle Tiere dieser beiden Gruppen bildeten im postoperativen Verlauf eine zirkuläre, lokal auf den Kleberapplikationsort begrenzte und ihm eng anliegende Kapsel aus (siehe Abb.18, 31, 60). Mikroskopisch ist eine gesteigerte Kollagensynthese mit

massenhaft Fibroblasten und Fibrozyten im gebildeten Kapselbereich festzustellen. Diese hohe Faserdichte, die fast narbenartig erscheint, zeigt, dass der Kleber als Fremdkörper identifiziert wird und im Sinne einer Fremdkörpergranulombildung reaktiv ummantelt wird. In der Kontrollgruppe „Nativ“ (N) fand bei keinem Tier eine Kapselbildung statt.

Eine Granulom- bzw. Fremdkörpergranulombildung ist per definitionem eine „knötchenförmige Neubildung aus Granulationsgewebe als Gewebereaktion auf allergische, infektiöse oder chronisch entzündliche (resorptive) Prozesse“ (Psychrembel, 1994). Natürlich ist eine perioperative bakterielle/ mykotische Kontamination im Sinne einer infektiösen Granulombildung denkbar, zumal insgesamt drei subkapsuläre Abszesse in der Gruppe K aufgefallen waren (Abb.17), jedoch hätte es dann bei jedem Tier mit einer Kapselbildung zwangsläufig zu einer Abszessausbildung und eventueller lokaler Gewebedestruktion kommen müssen. Bei insgesamt 21 Kapselbildnern (Gruppe K und KN) traten jedoch lediglich 3 Abszesse auf, Gewebedestruktionen wurden nicht beobachtet. In der Kontrollgruppe „Nativ“ hätte es statistisch gesehen auch zu einer Kapsel-/ Abszessausbildung kommen müssen, was jedoch nicht der Fall war. Gegen eine bakterielle/ mykotische Genese spricht weiter der histologische Befund. Eine bakterielle Infektion hätte neben der granulomatösen Entzündungsreaktion auch eine vermehrte lymphoplasmazelluläre Entzündungszellinvasion zur Folge, eine mykotische Infektion eher eosinophilen Charakter (Riede und Schaefer, 1995). Beides konnte in der Histologie nicht beobachtet werden. Weiter hätte histologisch das manipulierte, kontaminierte Gefäß distal bzw. proximal der Anastomose von einer Kapselbildung mitbetroffen sein müssen. Es ist jedoch eine isolierte, lokale Kapselbildung auf den Kleberapplikationsort zu verzeichnen, was eine Granulombildung im Sinne einer allergischen / chronisch entzündlichen Reaktion auf den Kleber selbst wahrscheinlicher macht.

Der naheliegendste Grund für diese Kapselbildung, die sowohl bei der Ziege als auch beim Kaninchen auftritt, liegt in der Zusammensetzung des Klebers. Ein Bestandteil des Zweikomponenten-Klebers ist 45 prozentiges, gereinigtes Rinderserum- Albumin. Möglich ist, dass nicht alle Albuminmoleküle mit der zweiten Komponente Glutaraldehyd eine chemische Bindung bei Applikation eingehen und ihre antigene Struktur frei präsentieren. Selbst wenn alle Albuminmoleküle gebunden wären, könnte eine antigene Oberfläche bleiben. Tanabe et al. berichteten im Jahr

2002 über multiple antigene Determinanten des Rinderalbumins, fungierend als IgE-Bindungsplätze, sowie über eine T-Zell-Stimulation als Auslöser einer humanen Rindfleischallergie. Die postoperative Kleber-/Antigenpersistenz bzw. Rinderalbuminpersistenz könnte der Auslöser einer allergisch (Typ IV-Reaktion), chronisch-entzündlich, zellvermittelten Immunreaktion sein. Folgen sind eine vermehrte Invasion von Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen sowie eine reaktive Fibroblastenaktivierung mit möglicher Kapsel-/Granulombildung. Es ist natürlich fraglich, ob eine humane Immunreaktion in dieser Art und Weise auf das Kaninchen übertragen werden kann.

Kiderlen zeigte in seinen in-vivo-Versuchen zur Akutreaktion nach Bioglueapplikation an der Universitätsklinik Bonn 2005, dass es innerhalb der ersten drei Tage nach Kleberapplikation bei mehr als 60% der Tiere zu einer mäßigen bis starken Entzündungsreaktion kam. Hierbei wanderten vorwiegend Granulozyten und vereinzelt Makrophagen über den Blutweg in die Gefäßwand Richtung Adventitia-Klebergrenze. Auch von Gewebeseite hatten sich vereinzelt inflammatorische Zellen am Kleber angesiedelt.

Die Einwanderungstendenz von Entzündungszellen bestätigt sich in dieser Studie. In der Gruppe KN kam es bei allen Tieren, in der Gruppe K bei 11 (91,7%) der Tiere zu einer massiven Infiltration von Entzündungszellen. Die Entzündungsreaktion besteht vorwiegend aus Granulozyten, Makrophagen, Histiozyten und Riesenzellen/Granulomzellen. Diese granulomatösen Entzündungszellen finden sich zirkulär um den Kleber, von wo sie mit dem Abbau des Klebers begonnen haben. Hierbei wird der Kleber in der Gruppe K bei 75% der Tiere und in der Gruppe KN bei 100% der Tiere sowohl von Gefäßwandseite als auch von Kapselseite her absorbiert. Bei 25 % der Tiere der Gruppe K geschah dies nur von Kapsel-Kleber-Seite aus.

Die Ergebnisse von Kiderlen (2005) in Kombination mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie unterstreichen die antigene Wirkung des Klebers.

Entzündungszellen wandern über den Blutweg und über das Umgebungsgewebe ein, wobei sie den Kleberapplikationsort direkt ansteuern, dort verbleiben und anfangen, diesen von allen Seiten her zu phagozytieren (siehe Abb.34 und 36). Es stellt sich die Frage, warum bei 25% der Tiere der Gruppe K der Kleberabbau nur von Kapsel-Kleber-Seite her geschah. Im Unterschied zur Gruppe KN erfolgte bei der Gruppe K der Einsatz eines Ballonkatheters. Möglicherweise führte eine perioperative Schädigung durch die Auswahl eines zu großen Ballondurchmessers

und dadurch verursachten übermäßigen Druck auf die Gefäßwand bei Dilatation zur postoperativen Ausbildung apoptotischer Veränderungen der Zellen und der Gefäßversorgung in der Gefäßwand (Kamenz et al., 2000). Dies könnte eine Limitierung der Zugangswege für Entzündungszellen bedeuten. Andererseits würde eine übermäßige Dilatation der Gefäßwand ein Einwandern von Makrophagen in die Gefäßschichten (Hanke et al., 1994) fördern. Es bleibt unklar, warum bei 25% der Tiere der Gruppe K ein Kleberabbau von Gefäßseite ausbleibt.

Allen Tieren ist jedoch gemeinsam, dass sich phagozytäre Entzündungszellen (Granulozyten, Makrophagen und Histiozyten) an den Kleber anlagern und anfangen, diesen zu phagozytieren. Hierbei fressen sie kleine Lakunen oder Septen in die zuvor homogen erscheinende Klebermasse (siehe Abb.40, 42). Kleinere Kleberstücke werden von den phagozytosefähigen Zellen aufgenommen und durch Peroxidasen und Lysozym im Zellinneren zersetzt. Dabei schwellen ihre Zellleiber immer mehr an, bis ihre Aufnahmekapazität erschöpft ist und sie platzen. Dieser Vorgang wird besonders in der immunhistochemischen Färbung MAC- 387 deutlich. Die rötlich angefärbte Granula, die zuerst intrazytoplasmal erscheint, wird nach dem Platzen der Zelle als diffuse rote Tüpfelung zwischen den neu eingewanderten Entzündungszellen sichtbar (siehe Abb.45,46).

Größere abgespaltene Kleberstücke, die nicht von einer Zelle alleine aufgenommen und phagozytiert werden können, regen Makrophagen zur Riesenzellbildung an. Mehrere Makrophagen lagern sich an ein Kleberstück an und vereinigen sich zu einer Riesen- bzw. Granulomzelle, was an der Vermehrung der Zellkernanzahl in einer Zelle deutlich wird. Auch ihre Zellleiber schwellen an, wobei sie fast schaumzellartiges Aussehen erreichen, bis sie dann endgültig zugrunde gehen und platzen (siehe Abb.41,42).

Durch diesen stetigen Abbauprozess fressen sich die Entzündungszellen durch die anfangs gebildeten Lakunen und Septen sternförmig immer tiefer in die Klebermasse (siehe Abb.36). Die vorherrschende Entzündungsreaktion bedingt ein Einwandern von Fibroblasten, die den entstandenen Defekt des Kleberabbaus mit Bindegewebe auffüllen. Dieses Phänomen konnte bei allen Tieren der Gruppe K und KN betrachtet werden. Bei *einem* Tier der Gruppe K war der Kleber sogar in der Mitte in zwei Teile gespalten bzw. abgebaut. Es imponierte an dieser Abbauzone ein lockeres bis straffes Bindegewebe (siehe Abb.32).

Die in dieser Studie beobachtete Entzündungsreaktion ist zwar konträr zu den

Ergebnissen von Gundry, findet jedoch Bestätigung in histologischen Auswertungen anderer Studien, in denen ebenfalls Bioglue verwendet wurde.

Herget et al. beschrieben (2001, 2003) in Studien an Schafen und Kaninchen, in denen sie zwei Trachea- bzw. Bronchialstümpfe mittels Bioglue anastomosierten, dass sich zwei Wochen nach dem operativen Eingriff eine Ansammlung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Histiozyten um den Kleber gebildet hatte. Nach vier Wochen hatte sich die Entzündungszellzahl massiv gesteigert und einen granulomatösen Charakter mit Riesenzellen erreicht. Zwölf Wochen postoperativ war neben der massiven Anzahl der Entzündungszellen eine fibröse, narbenartige Kapsel um den Kleber zu verzeichnen.

Zu gleichen histologischen Ergebnissen kamen Menon et al. (2003) in ihrer Studie an Ratten, in der sie Bioglue zur Seromprävention bei Mastektomie mit Lymphadenektomie verwendeten.

Im Hinblick auf den Kleberabbauprozess kommt eine Studie von Van et al. (2004) zu fast identischen histopathologischen Ergebnissen. In dieser Studie wurden an Hunden End-zu-End- Anastomosen der Arteria iliaca externa mittels Bioglue geklebt. Eine histologische Auswertung erfolgte nach 6 Wochen und 3 Monaten. Van et al. beschreiben eine frühzeitige Invasion von Granulozyten an der Oberfläche des Klebers. Die Entzündungszellinvasion nimmt an Dichte mit der Zeit zu, bis sich eine dicke Schicht „Granulozytenrasens“ mit vereinzelt Makrophagen gebildet hat. Die Oberfläche des Klebers ist hier völlig homogen bzw. glatt. Elektronenmikroskopisch lässt sich in einem weiteren Schritt eine sehr hohe enzymatische Reaktion von Granulozyten mit der Oberfläche des Klebers nachweisen. Die Granula der Granulozyten nimmt zu, vereinzelt degranuliert zugrunde gegangene Granulozyten werden sichtbar. Der Kleber erscheint in seiner Oberflächenbeschaffenheit rau. Granulozyten fangen an, den Kleber zu zersetzen. Die Kleberdicke nimmt ab diesem Zeitpunkt kontinuierlich ab. In einem nächsten Schritt treten Makrophagen hinzu, welche um größere abgespaltene Kleberstücke Riesenzellen ausbilden. Weiter wandern vermehrt Fibroblasten ein, die für eine bindegewebige Defektausfüllung verantwortlich sind. Wie auch in der vorliegenden Studie konnte bei *einem* Tier eine totale Phagozytose des Klebers festgestellt werden. Der phagozytotische Defekt war ebenfalls mit straffem Bindegewebe aufgefüllt worden (Abb.34).

Es wird ersichtlich, dass die Applikation von Bioglue eine Invasion von Entzündungszellen granulomatösen Charakters und eine reaktive Kapselbildung um

den Kleber fördert bzw. auslöst. Diese beiden Phänomene treten nach Bioglueapplikation in vergleichbarer Reaktion bei Hunden, Schafen, Ratten und Kaninchen auf. Bei Ziegen zeigte sich in Grundry's Studie (2000) dieses Bild nicht. Grundry hatte in seiner Studie mit insgesamt 3 Ziegen eine sehr kleine Fallzahl, eine Kontrollgruppe gab es nicht. Eine Ziege wurde nach 24 Stunden ausgewertet, eine weitere nach 10 Monaten, die letzte nach 12 Monaten. Die oben aufgeführten Studien an Kaninchen, Schafen und Hunden hatten eine Fallzahl zwischen 8 und 30 Tieren. Der Beobachtungszeitraum lag zwischen 4 Wochen und 3 Monaten. Denkbar ist, dass es erst nach 24 Stunden zu einer ersten Immunantwort auf den Kleber kommt und Grundry folglich keine Entzündungszellinvasion sehen konnte. Diese Entzündungsreaktion könnte sich dann wie in den anderen Studien und auch in der vorliegenden Studie beschreiben, ausbreiten und im Laufe der Zeit an Intensität abnehmen. Grundry's Beobachtungen nach zehn und zwölf Monaten könnten dann ein mögliches Endstadium der immunogenen Reaktion auf den Kleber bedeuten. Er berichtet schließlich auch über eine Kapselbildung zirkulär um den Kleber. Die Immunantwort auf den Kleber in den Studien an Kaninchen, Ratten, Schafen und Hunden würde demnach ein Intermediärstadium darstellen. Die Tierspezies Ziege könnte natürlich auch über ein anderes Immunantwortverhalten auf den Kleber verfügen, als es bei Kaninchen, Schaf, Hund und Ratte der Fall ist. Es ist demnach interessant, in einer weiteren Studie die Immunantwort auf den Kleber an Ziegen in einem Zeitraum zwischen 2 Tagen und 3 Monaten zu untersuchen. Im Gegenzug müsste eine Beurteilung des Klebers nach 10 und 12 Monaten an Kaninchen, Hunden, Schafen und Ratten erfolgen. Einen völlig neuen Aspekt bietet die vorliegende Studie durch die Tatsache, dass es neben der Entzündungszellinvasion bei Kleberpräsenz sowohl bei 100% der Tiere der Gruppe K, als auch bei 100% der Tiere der Gruppe KN zu Verkalkungen kommt. Diese Verkalkungen kommen sowohl innerhalb der Gefäßwand unterhalb des Klebers, als auch innerhalb der dem Kleber anliegenden Kapsel vor. In der Gruppe N konnten keine Gefäßverkalkungen festgestellt werden. Wichtig ist, dass es Unterschiede in der Lokalisation der Verkalkung innerhalb der Gefäßwandung gibt, jedoch die Verkalkung sich immer auf die komplette Länge der Kleberapplikation erstreckt. Der Gruppe K und KN ist gemeinsam, dass es bei allen Tieren zu einer Verkalkung innerhalb der Kapsel um den Kleber kam. In der Gruppe KN konnten zu diesen

Verkalkungen innerhalb der Kapsel bei 100% der Tiere Verkalkungen im Bereich der Adventitia und der Media verzeichnet werden. In der Gruppe K bildeten ebenfalls 58,3% der Tiere eine zusätzliche Verkalkung in der Adventitia und Media aus. 33,3% der Tiere boten eine Kalkansammlung in der Media und Teilen der Intima, während 8,3% zusätzlich eine alleinige Verkalkung der Intima aufzeigten. In diesem Fall lag das Endothel den eosinophil bis lila erscheinenden, schuppigen Kalkansammlungen direkt auf (siehe Abb. 49,50). Neben diesen Kalkschüppchen sind auch Verkalkungsvorstufen zu finden. Es scheint, als ob kernhaltige Zellen der arteriellen Wandschichtung, Fibroblasten und kollagene Fasern Calciumphosphate einlagern, untergehen und sich in der Masse zu Kalkschüppchen zusammenlagern. Bei zellkernhaltigen Zellen kann hierbei ein Stadium mit stark pyknotischem Zellkern und aufgetriebenem Zytoplasma beobachtet werden. Kollagene Fasern, die keinen Zellkern besitzen, scheinen die Calciumphosphate einfach in ihre morphologische Struktur zu integrieren (siehe Abb.51).

Den Beweis, dass es sich bei der Kalkansammlung um eine calciumphosphathaltige Verkalkung handelt, liefert die spezifische, nach Krutsay modifizierte Kossa- Färbung durch eine starke schwarze Anfärbung der kalkhaltigen Strukturen (siehe Abb.53). Einen möglichen Erklärungsansatz für diese Wandverkalkung, die lediglich lokal unter der Kleberapplikationsfläche vorkommt, bietet das 10%ige Glutaraldehyd, welches die zweite Komponente des Bioglues darstellt.

Vorausschickend ist zu sagen, dass Glutaraldehyd von der Europäischen Union als eine toxische Substanz klassifiziert wurde (EU TN, UN 6). Glutaraldehyd wird im medizinischen Gebrauch vorwiegend zur Gewebefixation und als Bestandteil von Desinfektionsmitteln gebraucht. Eine rezidivierende Exposition kann beim Menschen Irritationen von Augen-, Nasen- und Rachenschleimhäuten hervorrufen. Weiter kann es Dermatosen und asthmatische Beschwerden verursachen (Vyas et al., 2000). Im direkten Kontakt mit Glutaraldehyd gehen vorrangig Fibroblasten und kollagene Fasern zugrunde bzw. verkalken (Korn et al. 1972, Cheung et al. 1981, 1982, 1985, Bowes et al. 1968), ohne den wirklichen Pathomechanismus zu kennen.

Kim fand im Jahre 2001 in seiner Untersuchung zur Auswirkung von Glutaraldehyd auf kernhaltige Zellen heraus, dass Glutaraldehyd einen generellen Speichereffekt von Calciumionen im Zellinneren auslöst. Hierbei bewies er einen massiv erhöhten Einstrom von Ca^{2+} -Molekülen über den L-Typ Ca^{2+} -Kanal in Gegenwart von Glutaraldehyd. Der Grund für diesen Effekt ist jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt noch

nicht bekannt.

Weitere wichtige Aspekte liefern die Ergebnisse der Studie von Meuris et al., in der das Verhalten von zellkernhaltigen und zellkernlosen Zellen unter dem Einfluss von Glutaraldehyd im in-vitro- Versuch an Schafen untersucht wurde. Sie bestätigten das Ergebnis der Studie von Kim und zeigten weiter auf, dass es bei zellkernlosen Bestandteilen, wie kollagenen Fasern, vorrangig durch eine entzündliche Gewebereaktion auf das Glutaraldehyd zu Verkalkung kommt. Hierbei führt eine durch Entzündungszellen vermittelte, bruchstückhafte Auflösung von Wandbestandteilen der kollagenen bzw. elastischen Fasern zu einer Mehraufnahme und Speicherung von Calcium, was eine Verkalkung zur Folge hat (Meuris et al., 2001). Hiernach könnte sowohl das Auftreten von Verkalkungen im Wandbereich der Arterie, als auch das Auftreten von Verkalkungen im Kapselbereich erklärt werden. Diese Verkalkungen können nach oben angeführten Studien durch den zytotoxischen Effekt des Glutaraldehyds selbst, als auch durch die vom Glutaraldehyd induzierte Entzündungsreaktion auftreten. Es ist nochmals zu erwähnen, dass es bei allen Tieren der Gruppe K und KN eine Verkalkung im Bereich der Kapsel gab. In der Gruppe KN fand sich zudem eine Arterienwandverkalkung im Bereich der Adventitia und Media. In der Gruppe K variiert das Gefäßwandverkalkungsmuster. 58,3% der Tiere bildeten eine Verkalkung im Bereich der Adventitia und Media aus, 33,3% im Bereich der Media und Intima und 8,3% isoliert in der Intima. Da bei alleiniger Kleberapplikation auf ein natives Gefäß (Gruppe KN) immer das gleiche Verkalkungsmuster auftritt, muss folglich die variierende Arterienwandverkalkung der Gruppe K durch die intraoperative Manipulation bedingt sein. Zum einen könnte der Einsatz des Ballonkatheters durch übermäßige Dilatation der Gefäßwand das Einwandern von Makrophagen in die Gefäßschichten (Hanke et al., 1994) fördern, welche die Ursache einer atheromatösen Plaquebildung sein können (Mitchinson und Ball, 1987; Rosenfeld, 1996). Der Ballonkatheter könnte neben dem zytotoxischen Effekt des Glutaraldehyds zu einer Wandschichtverkalkung, abhängig vom Wanddruck bei Dilatation, beitragen (Kamenz et al., 2000). In der histologischen Betrachtung hätten dann aber proximal bzw. distal der Anastomosen/ Kleberapplikationsfläche Wandverkalkungen sichtbar sein müssen, da die Ballonlänge so ausgewählt wurde, dass sie den Kleberapplikationsort um 0,5 bis 1 cm zu beiden Seiten überragt. Die Wandverkalkungen sind jedoch isoliert auf den Kleberapplikationsort begrenzt. Bei

der intraoperativen Präparation der Arteria carotis wurde die Adventitia für eine bessere Kleberhaftung minimal abpräpariert. Wahrscheinlich veränderte die unterschiedliche Adventitiadicke, die in der Gruppe KN nahezu konstant war, die Infiltrationstiefe des Glutaraldehyds. Folglich erreichte das Glutaraldehyd unterschiedliche Wandschichten, die nachfolgend verkalkten. Einen für diese These wichtigen Aspekt bietet die Studie von Fürst et al. aus dem Jahr 2005. Das Ziel dieser Arbeit war die Messung der freiwerdenden Glutaraldehydkonzentration nach Bioglueapplikation. Weiter wurde der zytotoxische Effekt auf lebende humane embryonale Fibroblasten und Mausmyoblasten untersucht. Ebenfalls erfolgte die Darstellung der in-vivo-Toxizität, wobei Bioglue auf Lungen und Lebergewebe und auf die Aorta von Kaninchen aufgetragen wurde. Fürst et al. bewiesen, dass polymerisierter Bioglue Glutaraldehydmengen freisetzt, die in-vitro als auch in-vivo zytotoxische Effekte induzieren. Weiter berichtet Fürst über eine hochgradige Entzündungsreaktion, Ödembildung und toxische Nekrosebildung an Leber und Lungengewebe. An der Kaninchenaorta kam es zu einer leicht- bis mittelgradigen Entzündungsreaktion. Hiernach könnte die Glutaraldehydkomponente, je nach Infiltrationstiefe, für eine Nekrosenbildung mit Entzündungszellinvasion und nachfolgender Verkalkung der Kapsel und Arterienwand verantwortlich sein. Einen weiteren neuen histopathologischen Befund, der ebenfalls in Studien von Kazui et al. (2001) und Hewitt et al. (2001) Erwähnung, jedoch keine nähere Erläuterung fand, stellt die Ausbildung eines Pseudoaneurysmas dar.

In der hier vorgelegten Studie konnte lediglich in der Gruppe K eine Ausbildung von Pseudoaneurysmen, die mit einer Häufigkeit von 33,3% beobachtet werden konnten, verzeichnet werden. In den Gruppen KN und N war bei keinem Tier eine Pseudoaneurysmenbildung festzustellen. Bei mikro- bzw. makroskopischer Betrachtung dieser Pseudoaneurysmen gewinnt man den Eindruck, als ob die zuvor gebildete fibröse Kapsel als äußerste Begrenzung oder sogar als Wand des Aneurysmas fungiert. Innerhalb dieses Aneurysmas war ein Thrombus im Stadium der Organisation zu verzeichnen (Abb.20 und 21). Da die Pseudoaneurysmenbildung nur in der Gruppe Klebeanastomose vorkam, ist diese am wahrscheinlichsten als Folge der intraoperativen Manipulation oder im Sinne einer postoperativen Anastomoseninsuffizienz zu werten. Der intraoperative Einsatz des Ballonkatheters könnte Endothel und Intimaläsionen hervorgerufen haben, die eine spätere

Ausbildung von Pseudoaneurysmen und Thromben zur Folge hätte (Picon et.al, 1997). In der histopathologischen Auswertung zeigte sich jedoch bei allen beurteilbaren Proben der Gruppe K ein durchgehend erhaltenes Endothel (siehe Abb. 50, 58), so dass der Einsatz des Ballonkatheters zwar eine Pseudoaneurysmabildung und Thrombenbildung begünstigt haben kann, jedoch nicht der alleinige Auslöser sein kann. Betrachtet man die Abbildungen 55, 56 und 57, so wird sichtbar, dass die Thrombus- bzw. Pseudoaneurysmabildung am ehesten von einer postoperativen Anastomoseninsuffizienz ausgeht. Zu sehen sind die beiden Gefäßenden, die zuvor zur direkten Anastomose adaptiert waren. Sie liegen hier weit voneinander disloziert und sind verkalkt. Zwischen diesen beiden Gefäßstümpfen hat sich ein Thrombus gebildet. Unter beiden Gefäßstümpfen erkennt man ebenfalls einen Thrombus, der die zuvor anheftende Adventitia vom Kleber abgehobelt hat. Es wird klar, dass es sich in diesem Fall um eine Anastomoseninsuffizienz handeln muss. Möglicherweise waren die beiden Gefäßenden trotz Einsatz fixer Haltenähte und Haltevorrichtung nicht optimal adaptiert, so dass es zu einer Spaltbildung oder zu einer kleinen, nach intraluminal reichenden Segelbildung kam. Kiderlen beschrieb in seiner Studie, dass es bei 90,5% der Klebeanastomosen zu einer 1-2 mm großen Spaltbildung zwischen den adaptierten Gefäßenden kam, wobei in dieser Studie keine Haltefäden oder Haltevorrichtungen verwendet wurden. In 63,2% dieser Fälle hatte sich dann ein Thrombus im Bereich des Spaltes und Gefäßlumens gebildet. Es ist zu bemerken, dass die Anastomose bzw. das Gefäß bei Kleberapplikation durch den Einsatz des Ballonkatheters fast systolischen Durchmesser erreicht, um iatrogene Stenosenbildung zu vermeiden. Die Arterie wird also durch den Kleber in ihrem fast systolischen Gefäßdurchmesser fixiert und verliert somit an Elastizität bzw. ihre Windkesselfunktion. Die Arterie wirkt unter der Kleberapplikationsfläche wie ein starres Rohr. Dieses starre Wandverhalten der Anastomose fördert die Bildung von Turbulenzen und Flussbeschleunigungen unterhalb der geklebten Anastomose und einen erhöhten Druck gegen das distale Ende der Kleberapplikationsfläche bei Eintreffen der pulsilen Druckwelle. Es wird ersichtlich, dass nur der kleinste Spalt oder das kleinste Segel im Anastomosengebiet prädisponierender Faktor für eine Pseudoaneurysma- bzw. Thrombenbildung sein kann, zumal sich zwei Gefäßenden nie hundertprozentig glatt adaptieren lassen. Weiter könnte der Kleberabbau zu einer Pseudoaneurysmabildung beitragen. Durch stetigen Abbau

könnte die Anastomose an Widerstandslager verlieren und bei vorhandener Anastomoseninsuffizienz schließlich aufbrechen und eine pseudoaneurysmatische Formation ausbilden. Die vielleicht bereits gebildete Kapsel könnte dann als äußere Begrenzung dienen. Dies sind jedoch nur spekulativ. Hinsichtlich der Thrombusbildung wäre eine weitere Studie an geklebten Anastomosen unter dem postoperativen Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern oder Heparinderivaten sinnvoll. Möglicherweise könnten hierdurch Pseudoaneurysmen bzw. Thrombusbildungen im Spalt- / Segelbereich vermieden werden.

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie zur experimentellen Langzeituntersuchung von Klebeanastomosen an Kaninchencarotiden machen deutlich, dass es nach Bioglueapplikation zu einer deutlichen Immunreaktion auf den Kleber kommt. Die beiden Biogluekomponenten Rinderserumalbumin und Glutaraldehyd sorgen für eine massive Entzündungsreaktion mit nachfolgender Fremdkörpergranulombildung. Es entsteht eine Kapsel zirkulär um den Kleber; der Kleber wird von der Gefäß- und Kapselseite nachfolgend phagozytiert bzw. abgebaut. Der entstandene Defekt wird bindegewebig ersetzt. Prinzipiell könnte man sagen, dass die Entzündungszellinvasion mit nachfolgender Phagozytose / Abbau des Klebers wünschenswert ist, zumal es zu einer bindegewebigen Defektausfüllung kommt. Doch leider führt diese massive Entzündungszellinvasion in Kombination mit der zytotoxischen Eigenschaft des Glutaraldehyds zu einer massiven Verkalkung der Gefäßwand. Weiter konnten Verkalkungen im Kapselbereich um den Kleber verzeichnet werden. Meines Erachtens schließt die Ausbildung von Gefäßwandverkalkungen den eventuellen Einsatz von Bioglue in der konventionellen bzw. minimal-invasiven Bypasschirurgie aus bzw. minimiert seinen Erfolg. Eine ohnehin schon bestehende Koronaratherosklerose könnte durch den Einsatz von Bioglue beschleunigt werden. Gerade im Bereich der Bypasschirurgie könnten beschleunigte Bypassostiumstenosen bzw. Bypassverschlüsse auftreten.

Es ist natürlich fraglich, ob diese tierexperimentellen Daten einfach auf den Menschen übertragen werden können. Im Gegensatz zu den Carotiden eines Kaninchens ist die Wanddicke einer menschlichen Koronarie dicker. Es ist fraglich, ob es zu gleichartigen Arterienwandverkalkungen kommt, wie es beim Kaninchen der Fall ist.

Meiner Meinung nach könnte es zu gleichen Verkalkungsmustern beim Menschen kommen, da der Atherosklerosepathomechanismus des Kaninchens dem des Menschen sehr ähnlich ist, was breit erforscht ist (Narayanaswamy et al. 2000, Antischkow 1914, Schenck et al. 1966, Vessilionovitch 1988). Das Kaninchen gilt als etabliertes Versuchstier im Atherosklerosemodell. Die hohe Verschlussrate von 76,9 % macht deutlich, dass der Kleber, der trotz seiner unerwünschten Gewebereaktion über eine sehr gute biomechanische Komponente verfügt, einer weiteren Modifikation bedarf. Vielleicht ist durch die Verwendung von gereinigtem, humanem Albumin und durch eine Reduktion der Glutaraldehyddosis eine bessere Gewebeverträglichkeit zu erzielen. Hier bedarf es weiterer Grundlagenforschung seitens des Herstellers. Weiter sollte der derzeit praktizierte klinische Einsatz von Bioglue in der Aorten Chirurgie zur Therapie der akuten Typ A- Aortendissektion überdacht bzw. untersucht werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden experimentellen Studie soll anhand eines sensitiven Tiermodells das in-vivo- Langzeitverhalten des biokompatiblen Gewebeklebers Bioglue anhand von geklebten, nahtfreien End-zu-End- Anastomosen an Kaninchencarotiden untersucht werden.

Die Studie umfasst 34 Carotiden von insgesamt 17 Kaninchen. Aufgrund der verschiedenen operativen Behandlung erfolgte die Einteilung in 3 Gruppen. In der Gruppe „Klebeanastomose“ (K, n=12) wurde nach Durchtrennung der Arteria carotis communis ein Ballonkatheter über die Arteria carotis externa eingeführt und in das Lumen des distalen Carotisstumpfes vorgeschoben. Durch angebrachte fixe Haltenähte und moderate Entfaltung des Ballons konnte die Anastomose fixiert und stabilisiert werden. Anschließend erfolgte die zirkuläre Applikation von Bioglue.

In der Gruppe „Kleber auf Nativ“ (KN, n=9) wurde der Kleber ohne Ballonkathetertechnik in einer Länge von ca. 1 cm, ventralseitig, auf die nativ belassene Arteria carotis communis aufgetragen.

Die Gruppe „Nativ“ (N, n=9) erfuhr lediglich eine Freilegung und Darstellung der Arteria carotis communis. Hier wurden die Gefäße ohne Manipulation bzw. Kleberapplikation in situ belassen. Bei allen Carotiden erfolgte vor Wundverschluss eine Überprüfung des Blutflusses mittels einer Flusssonde. Insgesamt wurden 3 Anastomosen in Vorversuchen mit fortlaufender Suture genäht. Aufgrund iatrogen bedingter Stenosen/Thromben wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Eine Carotide war im Rahmen einer Abszessbildung zersetzt.

Nach ca. 60 Tagen wurde eine digitale Subtraktionsangiographie (DSA) durchgeführt. Die Proben wurden nachfolgend entnommen und makroskopisch begutachtet. Anschließend erfolgte die histopathologische Auswertung an Hämatoxylin-Eosin- und Elastica van Gieson- gefärbten Präparaten. Ein Kalknachweis erfolgte mittels der modifizierten Versilberung nach Kossa. Ebenfalls wurde eine immunhistopathologische Auswertung von MAC 387- gefärbten Präparaten vorgenommen.

In der vorliegenden Studie konnten sowohl die Technik, als auch die akute Haltbarkeit bzw. Offensein von End-zu- End- Klebeanastomosen an Kaninchencarotiden demonstriert werden. Alle Gefäße waren nach

Anastomosierung durchgängig. Nachblutungen oder akute Gefäßverschlüsse wurden nicht beobachtet.

Die Angiographie nach 60 Tagen zeigte, dass in der Gruppe K insgesamt nur 3/12 Anastomosen durchgängig waren. Eine Anastomose wies einen Stenosegrad 2 (1-29%) auf, eine weitere Stenosegrad 3 (30-69%). Die dritte Anastomose zeigte einen Stenosegrad 4 (70-99%). 9 Gefäße waren mit einem Stenosegrad 5 (100%) total okkludiert. Die Gruppe KN wies zu 100% einen Stenosegrad 2 (1-29%) auf, während die Gruppe N zu 100% keine Stenosen aufzeigte. In der Gruppe K konnte 1 Pseudoaneurysma angiographisch gesichert werden.

Makroskopisch konnte bei allen Tieren der Gruppe K und KN eine derbe Kapselbildung um den Kleber verzeichnet werden. Der Kleber imponierte insgesamt sehr spröde und porös. Vereinzelt Stücke hatten sich vom ansonst homogenen Kleberstamm in beiden Gruppen abgelöst. Weiter zeigte sich in den Gruppen K und KN bei allen Tieren eine Verkalkung im Bereich der Kapsel um den Kleber und in der Gefäßwand. Diese Gefäßwandverkalkungen treten isoliert unterhalb der Kleberapplikationsfläche auf. Proximal und distal des Kleberapplikationsortes zeigten sich keine Verkalkungen. In der Kontrollgruppe N waren keine Verkalkungen festzustellen. In der Gruppe K konnten 4 Pseudoaneurysmen sowie 3 intrakapsuläre sterile Abszesse gefunden werden. Histologisch bildeten alle Tiere der Gruppen K und KN eine derbe, narbenartige Kapsel mit hoher Fibroblastenaktivität / Kollagenneogenese zirkulär um den Kleber aus. Bei allen Tieren der Gruppe K und KN zeigte sich eine auf den Kleberapplikationsort beschränkte massive Invasion von Granulozyten, Histiozyten und Makrophagen. Diese granulomatöse Entzündungsreaktion konnte immunhistochemisch bestätigt/ identifiziert werden. Der Kleber wurde von Kapsel und Gefäßseite her abgebaut, der entstandene Defekt wurde bindegewebig aufgefüllt.

Alle Gefäße der Gruppen K und KN wiesen eine Verkalkung der Gefäßwand und der Kapsel auf, die lokal auf den Kleberapplikationsort beschränkt war. Mittels der modifizierten von Kossa- Färbung konnten diese Verkalkungen bestätigt werden. In der Gruppe N waren keine Verkalkungen und Entzündungsreaktionen festzustellen. In der Gruppe K konnten bei 3 Tieren Pseudoaneurysmen gefunden werden.

Die Ergebnisse dieser Studie machen deutlich, dass es nach der Applikation von Bioglue zu einer Fremdkörpergranulombildung mit massiver Entzündungszellinvasion kommt. Der Kleber wird durch phagozytäre Entzündungszellen abgebaut und bindegewebig ersetzt, was primär wünschenswert erscheint. Vor allem durch die zytotoxische Glutaraldehydkomponente bedingt, kommt es jedoch zu einer isolierten Arterienwandverkalkung und Kapselverkalkung am Kleberapplikationsort. Aufgrund der Bioglue- induzierten Verkalkungen ist der Einsatz dieses Gewebeklebers sowohl in der konventionellen, als auch minimal-invasiven Bypasschirurgie nicht geeignet. Eine weitere Modifikation bzw. Reduktion der Glutaraldehyddosis könnte den ansonsten positiv zu bewertenden Kleber „gewebeverträglicher“ machen. Weiter sollte der derzeit praktizierte Gebrauch von Bioglue zur Therapie der akuten Typ A- Aortendissektion kritisch geprüft, bzw. näher untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Ahmed AA, Mahadevan VS, Webb SW, MacGowan SW. Glue aortoplasty repair of aortic dissection after coronary angioplasty. *Ann Thorac Surg* 2001 Sep;72:922-924.
- (2) Albes JM, Krettek C, Hausen B, Rohde R, Haverich A, Borst HG. Biophysical properties of the gelatin-resorcin-formaldehyde/glutaraldehyde adhesive. *Ann Thorac Surg* 1993 Oct;56:910-915.
- (3) Antischkow N. Über die Atherosclerose der Aorta beim Kaninchen und über deren Entstehungsbedingungen. *Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie* 1914;59:308-348.
- (4) Bachet J, Gigou F, Laurian C, Bical O, Goudot B, Guilmet D. Four-year clinical experience with the gelatin-resorcine-formol biological glue in acute aortic dissection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982 Feb;83:212-217.
- (5) Bachet J, Goudot B, Teodori G, Brodaty D, Dubois C, De Lentdecker P, et al. Surgery of type A acute aortic dissection with Gelatine-Resorcine- Formol biological glue: a twelve-year experience. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1990 May;31:263-273.
- (6) Bachet J, Termignon JL, Goudot B, Dreyfus G, Piquois A, Brodaty D, et al. Late reoperations in patients with aortic dissection. *J Card Surg* 1994 Nov;9:740-746.
- (7) Bachet J, Goudot B, Dreyfus G, Banfi C, Ayle NA, Aota M, et al. The proper use of glue: a 20-year experience with the GRF glue in acute aortic dissection. *J Card Surg* 1997 Mar;12:243-253.
- (8) Bachet J, Guilmet D. The use of biological glue in aortic surgery. *Cardiol Clin* 1999 Nov;17:779-796.
- (9) Bachet J, Goudot B, Dreyfus G, Brodaty D, Dubois C, Delentdecker P, et al. Surgery of acute type A dissection: what have we learned during the past 25 years? *Z Kardiol* 2000;89 Suppl 7:47-54.
- (10) Barone R, Pavaux C, Bline PC, Cuq P. *Atlas d'Anatomie du lapin*. Paris: Masson et C^{ie}; 1973.
- (11) Basu S, Marini CP, Bauman FG, Shirazian D, Damiani P, Robertazzi R, et al. Comparative study of biological glues: cryoprecipitate glue, two-component fibrin sealant, and "French" glue. *Ann Thorac Surg* 1995 Nov;60:1255-1262.
- (12) Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 1991 Aug 15;325:445-453.

- (13) Benetti F, Mariani MA, Sani G, Boonstra PW, Grandjean JG, Giomarelli P, et al. Video-assisted minimally invasive coronary operations without cardiopulmonary bypass: a multicenter study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996 Dec;112:1478-1484.
- (14) Bingley JA, Gardner MA, Stafford EG, Mau TK, Pohlner PG, Tam RK, et al. Late complications of tissue glues in aortic surgery. *Ann Thorac Surg* 2000 Jun;69:1764-1768.
- (15) Boehm DH, Reichenspurner H, Gulbins H, Detter C, Meiser B, Brenner P, et al. Early experience with robotic technology for coronary artery surgery. *Ann Thorac Surg* 1999 Oct;68:1542-1546.
- (16) Bowes JH, Cater CW. The interaction of aldehydes with collagen. *Biochim Biophys Acta* 1968;168:341-352.
- (17) Brandtzaeg P. MAC 387 antibody and detection of formalin resistant myelomonocytic L1 antigen. *J Clin Path* 1988;41:963-970.
- (18) Brandtzaeg P. The leucocyte protein L1 (calprotectin): usefulness as an immunohistochemical marker antigen and putative biological function. *Histopathol* 1992;21:191-196.
- (19) Braunwald NS, Gay W, Tatroles CJ. Evaluation of crosslinked gelatin as a tissue adhesive and hemostatic agent: an experimental study. *Surgery* 1966 Jun;59:1024-1030.
- (20) Bruckenberg E. [Status of heart surgery in Germany, 1990. Report of the hospital committee of the work group of the Surgeon General]. *Thorac Cardiovasc Surg* 1991 Oct;39:310-316.
- (21) Bruckenberg E. 8. Bericht des Krankenhausausschusses der Arbeitsgemeinschaft der leitenden Medizinalbeamten (AGLMB) zur Situation der Herzchirurgie 1995 in Deutschland. E Bruckenberg, Selbstverlag 1996.
- (22) Bruckenberg E. Herzbericht 2000 mit Transplantationschirurgie, 13. Bericht des Krankenhausausschusses der AOLG. E Bruckenberg, Selbstverlag 2001 Aug 15.
- (23) Calafiore AM, Angelini GD, Bergsland J, Salerno TA. Minimally invasive coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1996 Nov;62:1545-1548.
- (24) Chao HH, Torchiana DF. BioGlue: albumin/glutaraldehyde sealant in cardiac surgery. *J Card Surg* 2003 Nov;18:500-503.
- (25) Cheung DT, Nimni ME. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen. *Connect Tissue Res* 1982;10:201-216.
- (26) Cheung DT, Nimni ME. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde I: reaction with model compounds. *Connect Tissue Res* 1982;10:187-199.

- (27) Cheung DT, Perelman N, Ko EC, Nimni ME. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reaction with collagen in tissues. *Connect Tissue Res* 1985;13:109-115.
- (28) Cooper CW, Falb RD. Surgical adhesives. *Ann N Y Acad Sci* 1968 Jan;146:214-224.
- (29) Coover HW, Joyner FB, Shearer NH, Wicker TH. Chemistry and performance of cyanoacrylate adhesives. *J Soc Plast Eng* 1959;15:413-417.
- (30) Coselli JS, Bavaria JE, Fehrenbacher J, Stowe CL, Macheers SK, Gundry SR. Prospective randomized study of a protein-based tissue adhesive used as a hemostatic and structural adjunct in cardiac and vascular anastomotic repair procedures. *J Am Coll Surg* 2003 Aug;197:243-252.
- (31) Culling CFA, Addison RT, Barr HT. *Cellular Pathology Techniques*. 4 th ed. London: 1985.
- (32) De Paulis R, Matteucci SL, Penta dP, Chiariello L. Cyanoacrylate glue as an alternative to an additional suture line in the repair of type A aortic dissection. *Tex Heart Inst J* 1999;26:275-277.
- (33) Diegeler A, Matin M, Falk V, Binner C, Walther T, Autschbach R, et al. Quality assessment in minimally invasive coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999 Nov;2:67-72.
- (34) Diegeler A, Matin M, Falk V, Battellini R, Walther T, Autschbach R, et al. Coronary bypass grafting without cardiopulmonary bypass-technical considerations, clinical results, and follow-up. *Thorac Cardiovasc Surg* 1999 Feb;47:8-14.
- (35) Eddy AC, Capps SC, Chi E, Yüksel U, Elkins RC. The effect of Bioglue surgical adhesive in the surgical repair of aortic dissection in sheep. XVI th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis . 1998.
- (36) Edmunds LH, Jr. Blood platelets and bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989 Mar;97:470-471.
- (37) Edmunds LH, Jr. Blood-surface interactions during cardiopulmonary bypass. *J Card Surg* 1993 May;8:404-410.
- (38) Edmunds LH, Jr. Why cardiopulmonary bypass makes patients sick: strategies to control the blood-synthetic surface interface. *Adv Card Surg* 1995;6:131-167.
- (39) Edmunds LH, Jr. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998 Nov;66:12-16.
- (40) Effler DB, Groves LK, Sones FM, Jr., Shirey EK. Increased myocardial perfusion by internal mammary artery implant: Vineberg's Operation. *Ann Surg* 1963 Oct;158:526-536.

- (41) Effler DB, Sones FM, Jr., Groves LK, Suarez E. Myocardial revascularization by Vineberg's internal mammary artery implant. Evaluation of postoperative results. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1965 Oct;50:527-533.
- (42) Effler DB, Groves LK, Sones FM, Jr. Myocardial revascularization by internal mammary artery implantation. Clinical experience. *Vasc Dis* 1966 Feb;3:42-48.
- (43) Effler DB, Groves LK, Suarez EL, Favaloro RG. Direct coronary artery surgery with endarterectomy and patch-graft reconstruction. Clinical application and technical considerations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1967 Jan;53:93-101.
- (44) Ennker IC, Ennker J, Schoon D, Schoon HA, Rimpler M, Hetzer R. Formaldehyde-free collagen glue in experimental lung gluing. *Ann Thorac Surg* 1994 Jun;57:1622-1627.
- (45) Ennker J, Ennker IC, Schoon D, Schoon HA, Dorge S, Meissler M, et al. The impact of gelatin-resorcinol glue on aortic tissue: a histomorphologic evaluation. *J Vasc Surg* 1994 Jul;20:34-43.
- (46) Erasmi AW, Sievers HH, Wolschlager C. Inflammatory response after BioGlue application. *Ann Thorac Surg* 2002 Mar;73:1025-1026.
- (47) Fabiani JN, Jebara VA, Deloche A, Carpentier A. Use of glue without graft replacement for type A dissections: a new surgical technique. *Ann Thorac Surg* 1990 Jul;50:143-145.
- (48) Falk V, Moll FH, Rosa DJ, Daunt D, Diegeler A, Walther T, et al. Transabdominal endoscopic computer-enhanced coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1999 Oct;68:1555-1557.
- (49) Falk V, Gummert JF, Walther T, Hayase M, Berry GJ, Mohr FW. Quality of computer enhanced totally endoscopic coronary bypass graft anastomosis-comparison to conventional technique. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999 Mar;15:260-264.
- (50) Favaloro RG. Bilateral internal mammary artery implants. Operative technique-a preliminary report. *Cleve Clin Q* 1967 Jan;34:61-66.
- (51) Favaloro RG, Effler DB, Groves LK, Sheldon WC, Sones FM, Jr. Direct myocardial revascularization by saphenous vein graft. Present operative technique and indications. *Ann Thorac Surg* 1970 Aug;10:97-111.
- (52) Firma CryoLife International IKG3U. Produktinformation Bioglue Surgical Adhesive. 1999.
- (53) Flavell DJ, Jones DB, Wright DH. Identification of tissue histocytes on paraffin sections by a new monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 1987;35:1217-1226.
- (54) Fukunaga S, Karck M, Harringer W, Cremer J, Rhein C, Haverich A. The use of gelatin-resorcin-formalin glue in acute aortic dissection type A. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999 May;15:564-569.

- (55) Fürst W, Banerjee A. Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity. *Ann Thorac Surg* 2005;79:1522-1529.
- (56) Gibbon JH, Jr., Allbritten FF, Jr., Stayman JW, Jr., Judd JM. A clinical study of respiratory exchange during prolonged operations with an open thorax. *Ann Surg* 1950 Oct;132:611-625.
- (57) Gibbon JH, Jr. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med* 1954 Mar;37:171-185.
- (58) Gibbon JH, Jr. Development of the artificial heart and lung extracorporeal blood circuit. *JAMA* 1968 Nov 25;206:1983-1986.
- (59) Gibbon JH, Jr. The development of the heart-lung apparatus. *Rev Surg* 1970 Jul;27:231-244.
- (60) Gillett R, Gull K. Glutaraldehyde--its purity and stability. *Histochemie* 1972;30:162-167.
- (61) Gundry SR, Black K, Izutani H. Sutureless coronary artery bypass with biologic glued anastomoses: preliminary in vivo and in vitro results. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000 Sep;120:473-477.
- (62) Hanke H, Hassenstein S, Ulmer A, Kamenz J, Oberhoff M, Haase KK, et al. Accumulation of macrophages in the arterial vessel wall following experimental balloon angioplasty. *Eur Heart J* 1994 May;15:691-698.
- (63) Herget GW, Kassa M, Riede UN, Lu Y, Brethner L, Hasse J. Experimental use of an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive for sealing pulmonary parenchyma and bronchial anastomoses. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001 Jan;19:4-9.
- (64) Herget GW, Riede UN, Kassa M, Brethner L, Hasse J. Experimental use of an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive for sealing tracheal anastomoses. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2003 Feb;44:109-113.
- (65) Hewitt CW, Marra SW, Kann BR, Tran HS, Puc MM, Chrzanowski FA, Jr., et al. BioGlue surgical adhesive for thoracic aortic repair during coagulopathy: efficacy and histopathology. *Ann Thorac Surg* 2001 May;71:1609-1612.
- (66) Kamenz J, Seibold W, Wohlfrom M, Hanke S, Heise N, Lenz C, et al. Incidence of intimal proliferation and apoptosis following balloon angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. *Cardiovasc Res* 2000 Feb;45:766-776.
- (67) Kazui T, Washiyama N, Bashar AH, Terada H, Suzuki K, Yamashita K, et al. Role of biologic glue repair of proximal aortic dissection in the development of early and midterm redissection of the aortic root. *Ann Thorac Surg* 2001 Aug;72:509-514.
- (68) Kiderlen M. Experimentelle Kurzzeitstudie zur angiographischen, histologischen und immunhistologischen Untersuchung einer nahtfreien End-zu-End- Anastomosentechnik an Kaninchencarotiden mit Bioglue; 2005.

- (69) Kim KM. Cellular mechanism of calcification and its prevention in glutaraldehyde treated vascular tissue. *Z Kardiol* 2001;90:99-105.
- (70) Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD. Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983 Dec;86:845-857.
- (71) Koehnlein HE, Lemperle G. Experimental studies with a new gelatin-resorcin-formaldehyde glue. *Surgery* 1969 Aug;66:377-382.
- (72) Korn AH, Fearheller SH, Filachione EM. Glutaraldehyde: nature of the reagent. *J Mol Biol* 1972 Apr 14;65:525-529.
- (73) Krutsay M. [On silver impregnation of the connective tissue. 2.]. *Zentralbl Allg Pathol* 1963 Jul 31;104:555-558.
- (74) Krutsay M. [Methods for demonstration of some calcium compounds in histological sections.]. *Acta Histochem* 1963 Apr 30;15:189-191.
- (75) Kucukaksu DS, Akgul A, Cagli K, Tasdemir O. Beneficial effect of BioGlue surgical adhesive in repair of iatrogenic aortic dissection. *Tex Heart Inst J* 2000;27:307-308.
- (76) Leclerc X, Goderoy O, Pruvo JP, Leys D. Computed tomographic angiography for the evaluation of carotid artery stenosis. *Stroke* 1995;26:1577-1581.
- (77) Leonard F, Kulkarni RK, Brandes G, Nelson J, Cameron JJ. Synthesis and degradation of poly (alkyl a-cyanoacrylates). *J Appl Polymer Sci* 1966;10:259-272.
- (78) Lillie RD. *Histopathologic Thechnic and Practical Histochemistry*. 3 rd ed. New York: 1965.
- (79) Menon NG, Downing S, Goldberg NH, Silverman RP. Seroma prevention using an albumin-glutaraldehyde-based tissue adhesive in the rat mastectomy model. *Ann Plast Surg* 2003 Jun;50:639-643.
- (80) Meuris B, Ozaki S, Herijgers P, Verbeken E, Flameng W. Influence of species, environmental factors, and tissue cellularity on calcification of porcine aortic wall tissue. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Oct;13:99-105.
- (81) Mitchinson MJ, Ball RY. Macrophages and atherogenesis. *Lancet* 1987 Jul 18;2:146-148.
- (82) Mohr FW, Falk V, Diegeler A, Autschback R. Computer-enhanced coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999 Jun;117:1212-1214.
- (83) MRC European Carotid Surgery Trial: interim results for symptomatic patients with severe (70-99%) or with mild (0-29%) carotid stenosis. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1991 May 25;337:1235-1243.

- (84) Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K. Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research. *SCVIR* 2000;11:5-17.
- (85) NatuTec GmbH. Mouse anti human Monocytes / Macrophages, Product datasheet. 2000. NatuTec GmbH, Frankfurt.
- (86) Oiwa H, Takamoto S, Murakami A, Tanaka O, Furuse A. Experimental study of small arterial anastomosis with gelatin-resorcin- formaldehyde glue and collagen sheet. *Artif Organs* 2001 Apr;25:281-291.
- (87) Picon PD, goncalves SC, Wainstein MV, Costa AF, Mengarda CV, Machado RP, et al. Atherosclerosis and acute arterial thrombosis in rabbits: a model using balloon desendothelisation without dietary intervention. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:415-417.
- (88) Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch. 257. Auflage ed. Walter de Gruyter, Berlin - New York; 1994.
- (89) Raanani E, Latter DA, Errett LE, Bonneau DB, Leclerc Y, Salasidis GC. Use of "BioGlue" in aortic surgical repair. *Ann Thorac Surg* 2001 Aug;72:638-640.
- (90) Reichenspurner H, Boehm DH, Welz A, Reichart B. [Minimally invasive heart surgery--a fad or a clinically recognized therapy method?]. *Z Kardiol* 1998 Aug;87:594-603.
- (91) Reichenspurner H, Boehm DH, Welz A, Schmitz C, Wildhirt S, Schulze C, et al. Minimally invasive coronary artery bypass grafting: port-access approach versus off-pump techniques. *Ann Thorac Surg* 1998 Sep;66:1036-1040.
- (92) Reichenspurner H, Boehm DH, Gulbins H, Detter C, Damiano R, Mack M, et al. Robotically assisted endoscopic coronary artery bypass procedures without cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999 Nov;118:960-961.
- (93) Reichenspurner H, Boehm D, Reichart B. Minimally invasive mitral valve surgery using three-dimensional video and robotic assistance. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1999 Jul;11:235-243.
- (94) Riede UN, Schaefer HE. Allgemeine und Spezielle Pathologie. 4. Auflage ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 1995.
- (95) Robicsek F, Rielly JP, Marroum MC. The use of cyanoacrylate adhesive (Krazy Glue) in cardiac surgery. *J Card Surg* 1994 May;9:353-356.
- (96) Romeis B. Mikroskopische Technik / Romeis. 17. Aufl. ed. München - Wien - Baltimore: Urban und Schwarzenberg; 1989.
- (97) Rosenfeld ME. Cellular mechanisms in the development of atherosclerosis. *Diabetes Res Clin Pract* 1996 Feb;30:1-11.
- (98) Rotker J, Trosch F, Grabosch D, Jahn UR, Kloska S, Grabellus F, et al. Vascular anastomosing by gluing--an experimental study. *Thorac Cardiovasc Surg* 2004 Feb;52:6-9.

- (99) Schenck EA, Gaman E, Feigenbaum AD. Spontaneous aortic lesions in rabbits. I. Morphologic characteristics. *Circ Res* 1966;19:80-88.
- (100) Schneider S. Entwicklung einer neuen Anastomosentechnik für die Bypasschirurgie mittels Gewebekleber; 2004.
- (101) Seelich T. Tissucol (Immuno-Vienna): Biochemistry and method of application. *J Head Neck Pathol* 1982;3:65-69.
- (102) Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. 2nd ed. St.Louis: Mosby; 1980.
- (103) Smith EE, Naftel DC, Blackstone EH, Kirklin JW. Microvascular permeability after cardiopulmonary bypass. An experimental study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987 Aug;94:225-233.
- (104) Sones FM, Jr. Cine-cardio-angiography. *Pediatr Clin North Am* 1958 Nov;5:945-979.
- (105) Sones FM, Jr. Cine-coronary arteriography. *Ohio Med* 1962 Sep;58:1018-1019.
- (106) Sones FM, Jr., Shirey EK. Cine coronary arteriography. *Mod Concepts Cardiovasc Dis* 1962 Jul;31:735-738.
- (107) Tanabe S, Kobayashi Y, Takahata Y, Morimatsu F, Shibata R, Nishimura T. Some human B and T cell epitopes of bovine serum albumin, the major beef allergen. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:1348-1353.
- (108) Thompson SW. *Selected Histochemical and Histopathological Methods*. Springfield (IL): 1966.
- (109) Toriumi M, Raslan WF, Friedmann M, Tardy ME. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesives. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;116:546-550.
- (110) Utley JR. Pathophysiology of cardiopulmonary bypass: current issues. *J Card Surg* 1990 Sep;5:177-189.
- (111) Utley JR. Cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1994 May;57:1365-1366.
- (112) Van BY, Forsyth RG, Narine K, Moerman A, Taeymans Y, Van Nooten GJ. Bovine glue (BioGlue) is catabolized by enzymatic reaction in the vascular dog model. *Ann Thorac Surg* 2004 Jun;77:2177-2181.
- (113) Vyas A, Pickering CAC, Oldham LA, Francis HC, Fletcher AM, Merrett T, et al. Survey of symptoms, respiratory function, and immunology and their relation to glutaraldehyde and other occupational exposures among endoscopy nursing staff. *Occup Environ Med* 2000;57:752-759.
- (114) Wilmore DW, Souba WW, Bessey PQ, Aoki TT, Smith RJ. Pathophysiology of trauma. *Acta Chir Scand Suppl* 1985;522:25-43.

- (115) Yüksel U, Peacock L, Thomas H, Black K. Characteristics of an experimental bioadhesive. XVI th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis . 6-12-1997.

Danksagung:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Welz für die Überlassung dieses Dissertationsthemas.

Mit Herrn Dr. W. Schiller ist die Arbeit gewachsen; viel konstruktive Freude ist damit verbunden.

Einen großen Dank gebührt Frau C. Peigney. Durch ihre unerschöpfliche Arbeit im herzchirurgischen Labor der Universitätsklinik Bonn hat sie zu einem beträchtlichen Teil dieser Dissertation beigetragen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. Eichelkraut und Herrn M. Sezia bedanken. Durch ihre fachliche Kompetenz im Umgang mit Tieren trugen sie beide erheblich zu der Erstellung und Durchführung des tierexperimentellen Modells bei.

Zuletzt möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Agethen bedanken, der diese Arbeit freundlicherweise lektorierte.